

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

FACOLTÀ DI AGRARIA

Dottorato di Ricerca in Entomologia Agraria

XX CICLO

Settore Scientifico-disciplinare MIUR: AGR11

Sede Amministrativa di Bologna

INTERAZIONI PIANTE – INSETTI MEDIANTE DA SEMIOCHIMICI

Tesi di Dottorato di Ricerca di:

ELISA FABBRI

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. PIERO BARONIO

Tutore:

Chiar.mo Prof. STEFANO MAINI

Esame finale anno 2008

INDICE

INTRODUZIONE	1
---------------------	----------

CAPITOLO 1

La comunicazione chimica nei sistemi tritrofici	3
--	----------

1.1 Semiochimici	3
-------------------------	----------

<i>1.1.1 Feromoni</i>	4
-----------------------	----------

<i>1.1.2 Allelochimici</i>	6
----------------------------	----------

1.2 Metaboliti secondari delle piante e loro ruolo nella comunicazione	8
---	----------

<i>1.2.1 Gli attacchi degli insetti fitofagi inducono nelle piante il rilascio di numerosi composti volatili</i>	10
--	-----------

<i>1.2.2 Esistenza nelle piante di un segnale sistemico</i>	12
---	-----------

<i>1.2.3 Ruolo biologico dei composti volatili emessi dalle piante danneggiate dai fitofagi</i>	13
---	-----------

<i>1.2.4 Meccanismi di induzione dei composti volatili</i>	15
--	-----------

CAPITOLO 2

Il sistema tritrofico pianta ospite – <i>Liriomyza trifolii</i> – <i>Diglyphus isaea</i>	17
---	-----------

2.1 Il genere <i>Liriomyza</i> Mik	17
---	-----------

2.2 <i>Liriomyza trifolii</i>	17
--------------------------------------	-----------

<i>2.2.1 Sistematica, distribuzione e piante ospiti</i>	17
---	-----------

<i>2.2.2 Morfologia e biologia</i>	18
------------------------------------	-----------

2.2.3 <i>Ecologia chimica</i>	20
2.2.4 <i>Importanza economica</i>	22
2.3 Parassitoidi di <i>L. trifolii</i>	22
2.4 <i>Diglyphus isaea</i>	23
2.4.1 <i>Sistematica, distribuzione e specie ospiti</i>	23
2.4.2 <i>Morfologia e biologia</i>	23
2.4.3 <i>Ecologia chimica</i>	25
2.4.4 <i>Ricerca dell'ospite da parte di <i>D. isaea</i>: lo stato dell'arte</i>	26
2.5 Obiettivo della ricerca	27
 CAPITOLO 3	
Materiali e metodi	29
3.1 Materiale biologico	29
3.2 Olfattometro	29
3.2.1 <i>Procedura sperimentale e valutazione delle scelte</i>	30
3.3 Fonti di odore analizzate	31
3.4 Campionamento ed estrazione dei composti volatili presenti nello spazio di testa dei campioni	32
3.4.1 <i>Metodologia di analisi statica: tecnica dell'SPME</i>	32
3.4.2 <i>Metodologia di analisi dinamica: tecnica dell'Air Entrainment</i>	33
3.4.2.1 <i>Saggi biologici con gli estratti</i>	34
3.4.3. <i>Analisi dei composti volatili</i>	35
3.5 Isolamento dei composti biologicamente attivi	35
3.5.1 <i>Tecnica della cromatografia liquido-solido (LC)</i>	35

3.5.1.1 Saggi biologici con le frazioni F_1 e F_2	36
3.6 Ruolo biologico dei composti identificati	37
3.6.1 Saggi con i composti puri	37
3.7 Analisi statistica dei dati	38

CAPITOLO 4

Risultati	39
4.1 Analisi e identificazione dei composti volatili presenti nello spazio di testa dei campioni	39
4.1.1 Composti volatili estratti attraverso la tecnica dell'SPME	39
4.1.2 Composti volatili estratti attraverso la tecnica dell'Air Entrainment	40
4.2 Saggi biologici all'olfattometro	43
4.2.1 Saggi con gli estratti ottenuti mediante la tecnica dell'Air Entrainment	43
4.2.2 Saggi con le frazioni F_1 e F_2 ottenute mediante la tecnica della cromatografia liquido-solido (LC)	44
4.2.3 Saggi con i composti puri	46

CAPITOLO 5

Discussione	53
5.1 Note metodologiche	53
5.2 Composti chimici rilasciati da piante di fagiolo infestate	55

BIBLIOGRAFIA CITATA	59
----------------------------	----

INTRODUZIONE

Gli organismi vegetali rappresentano per molti insetti una fondamentale risorsa alimentare fin dai tempi della comparsa degli esapodi sul nostro pianeta; non stupisce pertanto che le piante abbiano evoluto, nei loro confronti, sofisticate strategie di difesa. Alcuni meccanismi sono sempre attivi nelle piante (*difese costitutive*), mentre altri vengono attivati solo in presenza degli insetti fitofagi (*difese indotte*).

L'attivazione delle vie biochimiche, che si verifica nel corso dell'infestazione, risulta strettamente correlata sia al modo di nutrirsi dei fitofagi che al grado di danneggiamento nel punto di nutrizione.

Gli insetti ad apparato boccale pungente-succhiatore, come afidi e aleurodidi, che inducono danni lievi alle foglie, sono percepiti come se fossero agenti patogeni e attivano sia la via dipendente dall'acido salicilico che quella dipendente dall'acido giasmonico/etilene. Gli insetti ad apparato boccale masticatore e quelli che si nutrono di liquidi cellulari, come ad esempio coleotteri, acari e tripidi, provocano ai tessuti danni più estesi che portano all'attivazione di una via biochimica regolata dall'acido giasmonico, che segnala alla pianta la presenza di una lesione. L'effetto però cambia, a seconda che la ferita sia provocata dall'attività di nutrizione di un insetto fitofago o da un danno meccanico. In particolare le risposte indotte da un danno meccanico rappresentano una parte di quelle indotte dagli insetti (Walling, 2000). Tutti questi meccanismi, che agiscono interferendo con la nutrizione, con la crescita e lo sviluppo, con la fecondità e la fertilità dei fitofagi, provocandone la morte o ritardi nello sviluppo, sono definiti *difese dirette*.

L'attacco dei fitofagi induce nelle piante anche la sintesi di tutta una serie di composti volatili, che fanno parte di un meccanismo di *difesa indiretta*. La fun-

zione biologica di questi composti è di richiamare sulla pianta infestata i nemici naturali, affinché limitino, attraverso la loro azione di predazione e parassitizzazione, le popolazioni delle specie dannose. Numerosi parassitoidi localizzano i propri ospiti sfruttando le miscele di volatili rilasciate dalla piante danneggiate dai fitofagi (Turlings *et al.*, 1995; De Moraes *et al.*, 1998), che sono più facilmente reperibili nell'ambiente rispetto agli odori emessi dai soli fitofagi (Vet e Dicke, 1992). Anche *Diglyphus isaea* (Walker), un ectoparassitoide paleartico impiegato nella lotta biologica contro vari fillominatori, localizza l'ospite *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera Agromyzidae) sfruttando gli odori emessi dal complesso pianta (*Phaseolus vulgaris* L.) – minatore (*L. trifolii*) (Finidori-Logli *et al.*, 1996; Bazzocchi e Maini, 2000). Nonostante questi autori abbiano dimostrato come le piante infestate rivestano un ruolo fondamentale durante la ricerca, resta però ancora da chiarire quali siano le sostanze responsabili dell'attrazione del parassitoide *D. isaea* da parte di piante di fagiolo infestate da *L. trifolii*.

CAPITOLO 1

La comunicazione chimica nei sistemi tritrofici

1.1 Semiochimici

Con il termine *semiochimici* vengono indicati tutti quei composti che prendono parte alle interazioni tra gli organismi viventi, nei quali sono in grado di indurre modificazioni soprattutto di carattere etologico, talvolta anche fisiologico o perfino anatomico (Masutti e Zangheri, 2001). Sono composti attivi a concentrazioni molto basse e vengono generalmente classificati in *feromoni* e *allelochimici* (tab. 1.1). I primi agiscono a livello intraspecifico e favoriscono la comunicazione all'interno della specie, gli *allelochimici* hanno invece un effetto interspecifico e mediano la comunicazione tra specie e regni diversi.

Tabella 1.1 Messaggeri chimici (semiochimici) negli insetti.

FEROMONI (effetto intraspecifico)	ALLELOCHIMICI (effetto interspecifico)
sessuali	allomoni
aggregazione	
dispersione	caiomoni
aggressione o allarme	
traccia	sinomoni

1.1.1 Feromoni

I feromoni sono miscele di composti chimici che favoriscono la comunicazione tra individui appartenenti alla medesima specie. Ogni miscela si contraddistingue per composizione e concentrazione delle sostanze che la compongono ed è strettamente specie-specifica (Birch e Haynes, 1984). A seconda del tipo di risposta comportamentale che sono in grado di indurre, si distinguono diversi tipi di feromoni:

- *feromoni sessuali*
- *feromoni di aggregazione*
- *feromoni di dispersione*
- *feromoni di aggressione o di allarme*
- *feromoni di traccia*

I *feromoni sessuali* regolano l'accoppiamento, che avviene dopo due principali fasi comportamentali: una prima fase di localizzazione del partner, mediata da composti chimici definiti *attrattivi sessuali*, che hanno un effetto a distanza e una seconda fase di corteggiamento, mediata da specifici *feromoni di corteggiamento*, che hanno un effetto più ravvicinato. Per evitare che il corteggiamento possa avvenire tra individui dello stesso sesso, alcuni insetti emettono spesso anche *feromoni di contatto*. Questa efficace strategia è ad esempio utilizzata dai maschi di *Glossina morsitans* Westwood che, prima di iniziare il corteggiamento, si toccano con i tarsi. Se il contatto avviene tra maschi si libera un feromone (*astinone*) che inibisce il corteggiamento (Birch e Haynes, 1984).

Dal punto di vista chimico i *feromoni sessuali* sono spesso miscele di alcoli, aldeidi ed esteri, che possono essere sintetizzati dalle femmine, come avviene nella maggior parte dei Lepidotteri notturni, o dai maschi, come si verifica ad esempio in *Ceratitis capitata* (Wiedemann), o coinvolgere entrambi i sessi, in un vero e proprio “colloquio chimico”, come avviene in *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Celli e Maini, 1988).

I *feromoni di aggregazione* sono composti che inducono i membri di una medesima specie ad affluire e a concentrarsi nei pressi della sorgente emettitrice. Sono, per esempio, molto frequenti negli Scolitidi dove svolgono una duplice funzione. L'arrivo di migliaia di individui presso lo stesso albero consente a questi insetti di sopraffare i meccanismi di difesa della pianta, mentre la presenza di individui di sesso opposto aumenta la probabilità di accoppiamento (fig. 1.1 J) (Birch e Haynes, 1984).

I *feromoni di dispersione* hanno un effetto opposto a quelli di aggregazione e, anziché portare ad un aumento numerico di individui conspecifici su un determinato substrato, stimolano un comportamento che limita l'aggregazione e di conseguenza la competizione intraspecifica (Birch e Haynes, 1984). Uno dei feromoni di dispersione più studiati è quello di *Rhagoletis pomonella* (Walsh), la mosca americana delle mele. Dopo aver ovideposto in un frutto, la femmina lo marca con un feromone che ha l'effetto di ostacolare l'ovideposizione di altre femmine, riducendo in tal modo la competizione delle future larve per la fonte di nutrizione (fig. 1.1 N).

I *feromoni di aggressione o di allarme* innescano la fuga ed altri comportamenti di difesa (Masutti e Zangheri, 2001). Negli Afidi vengono emessi dai sifoni dorsali e inducono fenomeni di dispersione. Negli Imenotteri sociali vengono emessi da ghiandole poste in corrispondenza del pungiglione e stimolano comportamenti quali l'aggressività e il raggruppamento degli individui.

I *feromoni di traccia* sono molto comuni tra gli insetti sociali, specialmente tra formiche e termiti, che li utilizzano soprattutto per marcare itinerari di foraggiamento o durante il trasferimento della colonia ad una nuova sede (Birch e Haynes, 1984). A differenza dei feromoni di allarme, che si diffondono rapidamente e altrettanto rapidamente evaporano, quelli di traccia sono più stabili ed il messaggio persiste più a lungo.

1.1.2 Allelochimici

Gli allelochimici sono messaggeri chimici che consentono la comunicazione tra specie e regni diversi (vegetale e animale). Vengono inclusi negli allelochimici gli *allomoni*, i *caiomoni* e i *sinomoni*.

Gli *allomoni* sono segnali utili solo all'organismo che li emette. Fanno parte di questo gruppo tutte quelle sostanze chimiche di tipo difensivo, più o meno volatili, che sollecitano l'allontanamento di altre specie a vantaggio di quella emittente (Tremblay, 1999). Sono allomoni, per esempio, l'acido formico delle formiche, le sostanze repellenti secrete dalle cimici a scopo di difesa, il falso feromone di allarme di alcune specie di formiche schiaviste (es. *Formica subintegra* Emery e *Formica pergandei* Emery) usato per mettere in fuga dai loro nidi le operaie delle specie vittime allo scopo di rapirne le larve e le pupe (Regnier e Wilson, 1971) ed il secreto repellente "ant guard" che alcuni Imenotteri Vespoidei usano per allontanare le formiche dal proprio nido, impedendo loro di saccheggiarlo (Jeanne, 1970; Pardi e Turillazzi, 1985).

I *caiomoni* sono segnali favorevoli solo all'organismo che li riceve (Tremblay, 1999). Rientrano in questo gruppo i composti volatili emessi dalle piante che richiamano i fitofagi, la melata degli afidi che attira le crisope (fig. 1.1 L), gli odori presenti sulle uova che richiamano i parassitoidi oofagi (fig. 1.1 K) (Celli e Maini, 1988). Tra questi ultimi si può annoverare l'acido eptanoico emesso dalla larva della Tignola della patata (*Phthorimaea operculella* Zeller) e utilizzato dal suo parassitoide, l'Imenottero *Orgilus lepidus* Muesebeck, per localizzarla nelle gallerie scavate nei tuberi (Hendry *et al.*, 1973).

I *sinomoni* sono segnali favorevoli sia all'organismo emittente che al ricevente (Tremblay, 1999). Rientrano in questo gruppo l'odore emesso dai fiori che attira insetti pronubi (vantaggio per la pianta: la fecondazione incrociata; vantaggio per l'insetto: nettare e polline) (fig. 1.1 B) (Celli e Maini, 1988) e le sostanze volatili rilasciate da piante infestate che attirano i nemici naturali dei fitofagi. Foglie di

pomodoro infestate da *Liriomyza bryoniae* (Kaltenbach) e foglie di *Phaseolus lunatus* L. infestate da *Liriomyza sativae* (Blanchard), attirano rispettivamente i Braconidi *Dacnusa sibirica* (Telenga) (Dicke e Minkenberg, 1991) e *Opius dissitus* Muesebeck (Petitt *et al.*, 1992).

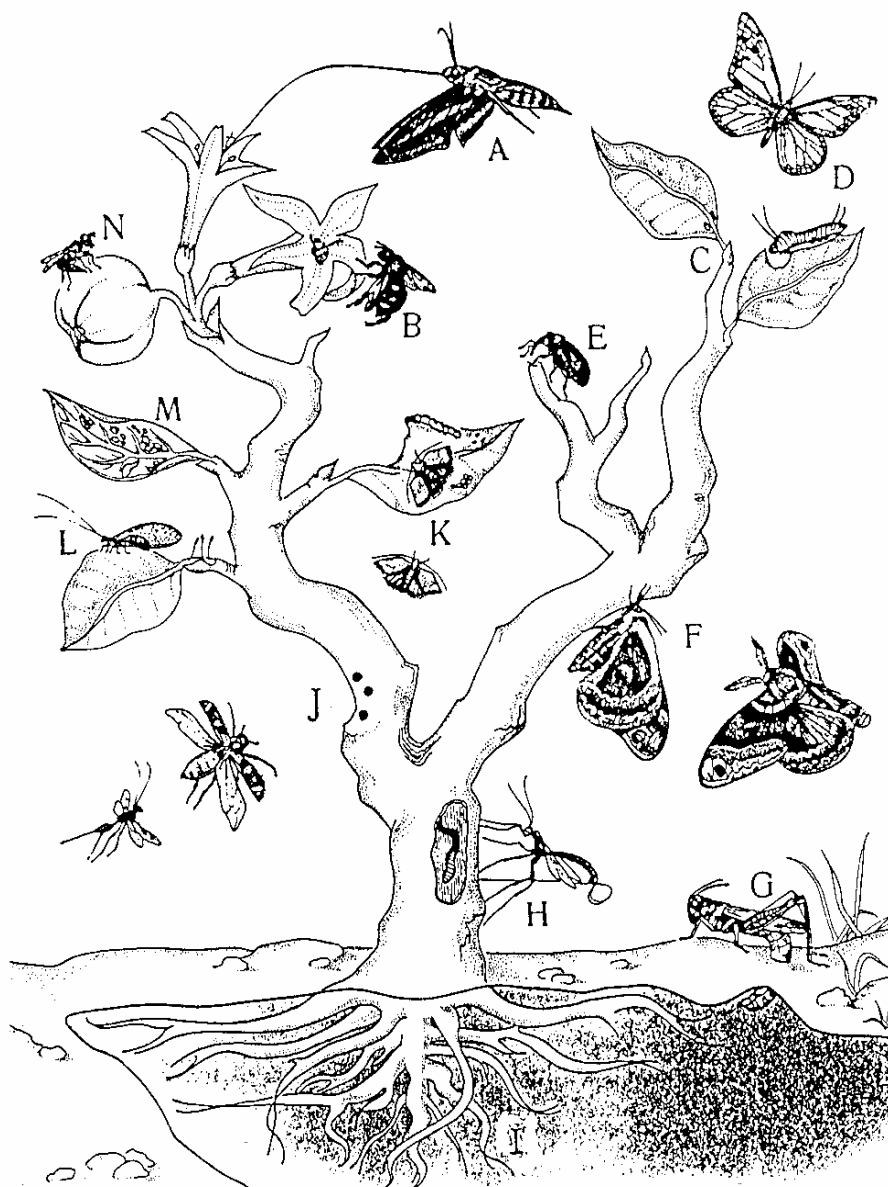


Figura 1.1 Differenti ruoli dei semiochimici negli insetti (da Hagen *et al.*, 1984).

Figura 1.1 segue

A - Sfingide che si nutre di nettare.

B - Ape che sta visitando un fiore. Il fiore emette composti volatili (*sinomoni*), responsabili dell'attrazione del pronubo.

C - Nettári extrafloriali: si tratta di un esempio di coevoluzione tra insetti e piante. I nettári emettono sostanze volatili (*sinomoni*) che attirano e ricompensano predatori e parassitoidi, che proteggono la pianta dagli attacchi dei fitofagi.

D - *Danaus plexippus* (L.): gli stadi larvali, nutrendosi di Euphorbiaceae, accumulano cardenolidi (*allomoni*), sostanze repellenti che verranno trasferite agli stadi seguenti di pupe e adulti, preservandole dai potenziali predatori.

E - *Anthonomus* sp. attratto dagli oli essenziali (*caiomoni*) emessi da piante di cotone. Il fatto che il ♂ del Curculionide sia costretto a nutrirsi della pianta di cotone per attirare le ♀♀, suggerisce la possibilità che uno o più costituenti della pianta vengano convertiti in *feromoni sessuali*.

F - Saturnide ♀ che attira un ♂ utilizzando un *feromone sessuale* che si origina da un idrocarburo volatile emesso dalla pianta ospite.

G - Ortottero nell'atto di ovideporre. L'ovideposizione avviene solo in caso di vegetazione rigogliosa e ricca di azoto.

H - *Pseudorhyssa sternata* Merrill ovidepone sfruttando il foro già praticato da *Rhyssa persuasoria* (L.) per paralizzare e ovideporre su una larva di Siricide, individuandolo grazie a sostanze volatili prodotte da un fungo simbionte del Siricide ed altre rilasciate da *R. persuasoria* durante l'ovideposizione.

I - Anche le radici emettono composti (*allomoni*) che agiscono da deterrenti per gli insetti che vivono nel suolo.

J - I terpeni volatili emessi dalla pianta attirano alcuni Coleotteri Scolitidi (detti "pionieri") che, una volta penetrati nel tronco di un pino, emettono *feromoni di aggregazione*, che attirano altri ♂♂ e ♀♀ fino a che non viene raggiunta una certa densità. A quel punto, per evitare un sovraffollamento che sarebbe fatale, alcuni dei componenti della miscela fungono da deterrenti (*allomoni*), impedendo ad altri Scolitidi di colonizzare lo stesso substrato.

K - Ovatura di una farfalla. Alcune scaglie dell'insetto si depositano sulle uova e sulle foglie liberando idrocarburi (*caiomoni*), che vengono utilizzati dai parassitoidi oofagi per localizzare il proprio ospite. Durante la ricerca, i tricogrammi sfruttano anche i composti (*caiomoni*) emessi dalle feci delle larve e dalle aree fogliari erose.

L - *Chrysoperla carnea* (Stephens) localizza la melata degli afidi, di cui si nutre, grazie ai composti (*caiomoni*) in essa contenuti.

M - Colonia di afidi su una foglia, attratti dagli zuccheri di cui è ricca la pianta.

N - Dittero Tefritide nell'atto di ovideporre. Nel compiere questa operazione, l'insetto marca il frutto con un feromone, che funge da deterrente per le altre ♀♀ della sua specie e contemporaneamente da *caiomone*, segnalando la presenza dell'ospite ai suoi parassitoidi.

1.2 Metaboliti secondari delle piante e loro ruolo nella comunicazione

Le piante danneggiate meccanicamente o da un insetto producono composti chimici volatili diversi per quantità e qualità da quelli prodotti dalle piante indenni. Il tipo di composti emessi sembra essere legato principalmente al fitofago

(specie, stadio di sviluppo) e alla pianta (specie, genotipo, età), sebbene anche gli stress ambientali possano determinare cambiamenti nella composizione delle miscele rilasciate (Paré e Tumlinson, 1999). Questi composti rappresentano nelle piante un meccanismo di *difesa indiretta*, in quanto possono attirare i predatori e i parassitoidi, possono indurre risposte difensive nelle piante vicine a quelle infestate e prendere parte ai processi che regolano il comportamento degli insetti fitofagi, facilitando o sfavorendo le loro interazioni con le piante. A questo riguardo si è visto che piante di grano indenni attirano gli afidi, mentre quelle già infestate rilasciano una miscela di composti che ha un effetto repellente su altri afidi (Quirroz *et al.*, 1997).

Oltre a rendere una foglia appetibile o sgradevole ad un fitofago, le miscele rilasciate a seguito del danno da insetto possono mediare le interazioni tra piante e terzo livello trofico, consentendo ai parassitoidi e ai predatori di distinguere le piante infestate da quelle indenni. È stato dimostrato, ad esempio, che piante di fagiolo e melo infestate da *Tetranychus urticae* Koch emettono composti volatili che attirano i suoi predatori (Takabayashi e Dicke, 1996), mentre piante di mais e cotone infestate da larve di Lepidotteri rilasciano composti che attirano i parassitoidi (Tumlinson *et al.*, 1993).

In tutti gli esempi riportati si osservano notevoli similitudini tra i composti emessi dalle foglie direttamente danneggiate dai fitofagi e quelli rilasciati dalle foglie indenni delle stesse piante. Inoltre, il fatto che piante infestate appartenenti a famiglie vegetali differenti emettano miscele chimiche simili, ha portato ad ipotizzare che, nel corso delle infestazioni, possano essere attivate vie biosintetiche comuni e che i prodotti di queste vie possano essere percepiti da un ampio spettro di entomofagi. La capacità di questi ultimi di percepire i segnali emessi dalle piante, distinguendoli da quelli di sottofondo presenti nell'ambiente, indica che le piante danneggiate dai fitofagi emettono composti chimici che sono distinguibili chiaramente da quelli emessi in risposta ad altri tipi di danno o da quelli rilasciati dalle piante indenni. La capacità delle piante di differenziare le proprie emissioni

sulla base del tipo di danno subito potrebbe essere legata alla presenza di induttori associati all'attività di nutrizione dell'insetto, che non sono presenti quando la foglia subisce un danno generico (Paré e Tumlinson, 1999).

1.2.1 Gli attacchi degli insetti fitofagi inducono nelle piante il rilascio di numerosi composti volatili

Una pianta indenne è caratterizzata da un livello base di metaboliti volatili, che sono emessi a livello della superficie fogliare e/o da siti specifici localizzati all'interno della foglia, in cui tali sostanze vengono accumulate. Queste riserve chimiche costitutive, rappresentate spesso da monoterpeni, sesquiterpeni e composti aromatici (fig. 1.2), vengono accumulate in quantità considerevoli all'interno di strutture specializzate, rappresentate da ghiandole o tricomi (Paré e Tumlinson, 1997a). Oltre a queste riserve, vi è un altro insieme di composti noti come *green-leaf volatiles*, che include alcoli saturi ed insaturi a sei atomi di carbonio, aldeidi ed esteri, prodotti attraverso la rottura dei lipidi di membrana (fig. 1.2) e rilasciati quando le foglie subiscono un danno meccanico.

Il danno compiuto dai fitofagi attraverso l'attività di nutrizione provoca, a livello delle porzioni danneggiate, il rilascio di numerosi composti chimici volatili, che rendono i profili gas-cromatografici di queste piante marcatamente differenti da quelli di piante indenni o danneggiate meccanicamente. Nel cotone, ad esempio, la rottura di speciali ghiandole presenti nelle foglie provoca il rilascio dei terpeni immagazzinati e aumenta l'emissione dei composti prodotti attraverso la via della lipossigenasi (*green-leaf volatiles*). Mentre il rilascio di questi metaboliti risulta strettamente correlato al danno inferto dall'insetto alla foglia, attraverso la sua attività di nutrizione, (Loughrin *et al.*, 1994), l'emissione di un sottoinsieme di terpeni (linalolo; β -ocimene; α -farnesene; β -farnesene; nonatriene; tridecatetraene), dell'indolo (un composto contenente azoto) e dell'acetato di 3-esenile è regolato prevalentemente dal fotoperiodo, con bassi livelli durante la notte e livelli

elevati durante il periodo di massima fotosintesi, sebbene il danno compiuto dall'insetto possa incrementarne l'emissione.

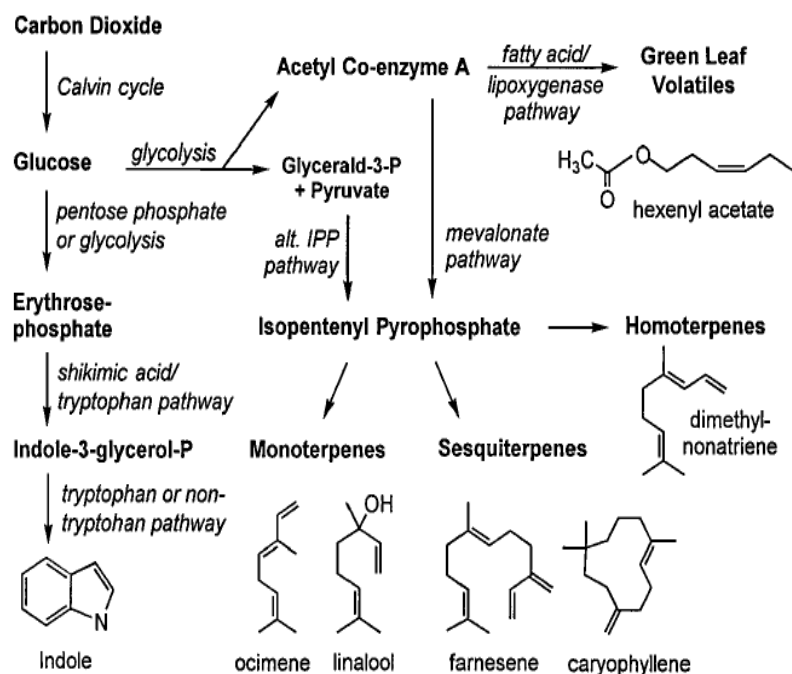


Figura 1.2 Vie biosintetiche che conducono al rilascio nelle piante dei composti volatili (da Paré e Tumlinson, 1999). L'indolo rappresenta il precursore di una famiglia di composti di difesa contenenti azoto e si forma a partire dall'indolo-3-glicerolo-fosfato attraverso la via biosintetica dell'acido scichimico (Frey *et al.*, 1997). Sia i sesquiterpeni che i monoterpeni sono sintetizzati a partire dall'isopentenil pirofosfato. La sintesi dei sesquiterpeni avviene nel citosol attraverso la via del mevalonato, mentre i monoterpeni sono sintetizzati a livello dei plastidi attraverso una via alternativa che coinvolge la gliceraldeide-3-fosfato e il piruvato (Lichtenthaler *et al.*, 1997). L'omoterpene (E)4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene si forma a partire dal farnesil pirofosfato, attraverso una serie di reazioni enzimatiche che portano complessivamente alla perdita di unità a quattro atomi di carbonio (Donath e Boland, 1994). I composti definiti "green leaf volatiles" si formano a partire da un derivato dell'acido linolenico, ovvero dall'acido 13-idroperossilinenico, che viene scisso in due frammenti, rispettivamente di 12 e di 6 atomi di carbonio. Dal frammento a 6 atomi di carbonio (3-esanale) derivano, attraverso numerosi riarrangiamenti, la vasta serie di composti denominati "green leaf volatiles".

Paré e Tumlinson (1997b) sostengono che i composti rilasciati in quantità più abbondante durante il giorno, soprattutto conseguentemente al danno compiuto dall'insetto, non siano immagazzinati nella pianta ma siano sintetizzati *de novo*, seguendo vie biosintetiche che risultano connesse strettamente al processo foto-

sintetico. Il ritardo che intercorre tra l'inizio del danno e il momento in cui i composti indotti cominciano ad essere emessi, conferma l'ipotesi che per sintetizzarli sia necessaria tutta una serie di reazioni biochimiche, che include anche l'espressione di geni, l'assemblamento di proteine e/o l'attivazione di enzimi.

1.2.2 Esistenza nelle piante di un segnale sistemico

L'identificazione dei composti volatili rilasciati dalle porzioni indenni di piante attaccate da insetti fitofagi ha permesso di dimostrare nelle piante l'esistenza di una emissione sistemica. Sia nel mais (Turlings e Tumlinson, 1992) che nel cotone (Röse *et al.*, 1996) il danno compiuto da larve di *Spodoptera exigua* (Hübner) si ripercuote anche sulle porzioni distali dal sito attaccato, dove induce il rilascio di numerosi composti volatili che risultano differenti da quelli emessi dalla pianta integra. In particolare, tra i composti emessi per via sistemica non si rinvenivano i prodotti della via biosintetica della lipossigenasi (esenoli e esenali) e neppure l'idolo, che sono invece rilasciati a livello delle porzioni o dei tessuti appena danneggiati, ad eccezione dell'acetato di 3-esenile, mentre si ritrovano numerosi terpenoidi (linalolo; 4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene; β -ocimene, β -farnesene, α -farnesene). Molti di questi composti volatili risultano emessi da numerose piante di interesse agrario, appartenenti a specie e famiglie differenti (tab. 1.2).

Stando ai risultati ottenuti da Paré e Tumlinson (1998) i composti volatili sistemici sarebbero sintetizzati a livello del punto di rilascio, mentre la trasmissione del messaggio dal sito danneggiato alle porzioni distali sarebbe legata alla presenza di particolari messaggeri chimici mobili, che sarebbero dislocati fino alle foglie distali indenni, dove indurrebbero la sintesi ed il rilascio dei composti volatili coinvolti nei meccanismi di difesa delle piante. Non è ancora chiaro se il rilascio di miscele simili in piante di specie o famiglie diverse sia innescato da un segnale comune o, al contrario, se l'emissione sia indotta da segnali differenti.

Tabella 1.2 Terpeni volatili rilasciati da diverse specie vegetali in risposta al danno compiuto da insetti fitofagi (da Paré e Tumlinson, 1999).

Pianta	(E)- β -Ocimene	Linalolo	(E)-4,8-Dimetil-1,3,7-nonatriene	(E,E)- α -Farnesene	(E)- β -Farnesene	(E,E)-4,8,12-Trimetil-1,3,7,11-tridecatetraene	Indicazioni bibliografiche
Cetriolo	+		+	+		+	Takabayashi <i>et al.</i> , 1994
Melo	+		+	+		+	Takabayashi <i>et al.</i> , 1991
Fagiolo di Lima	+	+	+		+	+	Takabayashi <i>et al.</i> , 1994
Cotone	+	+	+	+	+	+	Paré e Tumlinson, 1997a
Mais	+	+	+	+	+	+	Turlings <i>et al.</i> , 1990
Tabacco	+	+		+	+		De Moraes <i>et al.</i> , 1998
Patata	+	+		+	+		Bolter <i>et al.</i> , 1997

1.2.3 Ruolo biologico dei composti volatili emessi dalle piante danneggiate dai fitofagi

Se i parassitoidi localizzassero i propri ospiti affidandosi unicamente alla proprie capacità visive, la ricerca finirebbe spesso per essere vana. Infatti, a differenza degli insetti impollinatori, che vanno alla ricerca di bersagli (fiori) facilmente individuabili dal punto di vista visivo, i parassitoidi si sono specializzati nella ricerca di insetti fitofagi piccoli, che spesso sono ben mimetizzati e localizzati solitamente sulla pagina inferiore delle foglie. Sia McCall *et al.* (1993) che Steinberg *et al.* (1993) hanno dimostrato, attraverso una serie di analisi gascromatografiche e di prove condotte in tunnel del vento, come i soli odori emessi dai fitofagi siano segnali poco attrattivi e poco abbondanti, a differenza dei composti rilasciati dalle piante danneggiate dai fitofagi, che sono invece più facilmente reperibili nell'ambiente (Vet e Dicke, 1992).

Per la maggior parte degli entomofagi le piante sulle quali si nutrono i fitofagi forniscono importanti informazioni e contribuiscono alla localizzazione delle prede e degli ospiti.

Per esempio è stato dimostrato che piante di fagiolo (*P. lunatus*) danneggiate da *T. urticae* rilasciano una complessa miscela di composti volatili che attira *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, predatore di acari, contribuendo indirettamente

alla difesa della pianta (Dicke *et al.*, 1990; Bouwmeester *et al.*, 1999). Di tutti i composti volatili indotti dall'attività di nutrizione del tetranichide, i terpeni β -ocimene, linalolo, 4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene e metil salicilato sembrano ricoprire un ruolo importante per il predatore, facilitando la localizzazione della pianta dove è presente la preda (Dicke *et al.*, 1990).

In studi condotti in tunnel del vento, femmine di *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera Braconidae) si dirigono verso piante di *Vicia faba* L. infestate dal proprio ospite, l'afide *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera Aphididae) (Du *et al.*, 1996, 1997; Guerrieri *et al.*, 1993, 1997; Powell *et al.*, 1998). I soli ospiti e le sole piante risultano scarsamente attrattivi, a differenza delle piante infestate o recentemente danneggiate da afidi, suggerendo che l'attività di nutrizione del fitomizo induca nelle piante danneggiate l'emissione di composti volatili che agirebbero da sinomoni (Guerrieri *et al.*, 1996).

De Moraes *et al.* (1998) riportano che piante di tabacco, di cotone e di mais infestate da *Heliothis virescens* (F.) producono miscele di composti volatili differenti da quelle che le stesse piante rilasciano quando vengono attaccate da *Helicoverpa zea* (Boddie). Il parassitoide *Cardiochiles nigriceps* Viereck è in grado di percepire queste differenze, utilizzandole per distinguere le piante infestate dal proprio ospite, *H. virescens*, da quelle danneggiate da *H. zea*. La produzione da parte di specie di piante filogeneticamente differenti di segnali chimici altamente specifici, correlati alle specie fitofaghe e la capacità dei parassitoidi di sfruttare queste miscele, sottolineano la complessità delle interazioni che intercorrono tra piante e entomofagi.

Piante di *V. faba* e *P. vulgaris* danneggiate dall'attività di nutrizione e ovideposizione di *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera Pentatomidae), un insetto ad apparato boccale pungente-succhiatore, rilasciano una miscela di composti volatili che attira il parassitoide oofago *Trissolcus basalis* (Wollaston) (Hymenoptera Scelioidea) (Colazza *et al.*, 2004). L'analisi degli estratti ottenuti da entrambe le leguminose ha rivelato che il danno compiuto da *N. viridula* incrementa il rilascio

di alcuni terpenoidi come linalolo, β -cariofillene, 4,8,12-trimetil-1,3,7,11-tridecatetraene e 4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene, che potrebbero essere coinvolti nell'attrazione del parassitoide.

Questi esempi e i risultati ottenuti da numerosi altri studi rivelano, quindi, l'intricata e complessa moltitudine di interazioni che possono essere innescate dai metaboliti secondari emessi dalle piante.

1.2.4 Meccanismi di induzione dei composti volatili

Uno studio recente suggerisce che le risposte difensive delle piante, incluse quelle indirette che portano al rilascio dei composti volatili, siano potenziate da fattori presenti nella secrezione orale dei fitofagi. Questi composti, trasmessi attraverso l'attività di nutrizione, consentirebbero alle piante di distinguere un danno generico da uno specifico, provocato da un insetto, e quindi di modulare, sulla base della tipologia di danno, la qualità, la quantità e la durata delle proprie emissioni. Finora sono stati isolati due fattori che incrementano il rilascio di composti volatili nelle piante.

Una β -glucosidasi, isolata dal rigurgito di larve di *Pieris brassicae* (L.), induce nelle piante di cavolo il rilascio di una miscela di composti volatili simile a quella indotta dalle larve attraverso l'attività di nutrizione (Mattiacci *et al.*, 1995). Le β -glucosidasi sono enzimi che agiscono, presumibilmente, catalizzando in alcune famiglie vegetali (es. Brassicaceae) la scissione del glucosio dai composti organici a cui si trova legato. Una volta scissi dal glucosio, questi composti divengono volatili e possono essere rilasciati.

La volicitina, isolata dal rigurgito di larve di *S. exigua* (Alborn *et al.*, 1997), è un enzima che viene sintetizzato nella cavità boccale dell'insetto attraverso l'aggiunta di un gruppo idrossilico e di glicina all'acido linolenico, che è fornito direttamente dalla pianta di cui si nutre il fitofago (Paré *et al.* 1998). Nonostante Stanley-Samuelson (1994) abbia dimostrato come l'acido linolenico, fornito dalle

piante, sia indispensabile per la maggior parte delle larve di Lepidotteri, sorprende che questi insetti favoriscano la conversione di un acido grasso in un composto capace di innescare il meccanismo di difesa della pianta. È probabile, quindi, che questa molecola svolga una funzione importante nell'insetto, tale da rendere comunque questa sintesi vantaggiosa. Alcuni autori (Alborn *et al.*, 2000) hanno ipotizzato che la volicitina possa facilitare il trasporto e la digestione del cibo. Rimangono da chiarire ancora molti aspetti circa le interazioni chimiche che si instaurano tra piante ed insetti fitofagi. Sappiamo, per esempio, che esistono negli insetti altri composti attivi, strutturalmente simili alla volicitina e che danni provocati da specie fitofaghe differenti inducono nelle piante il rilascio di miscele quantitativamente diverse. È plausibile che induttori provenienti da insetti diversi inducano nelle piante risposte differenti. Ad oggi il meccanismo biochimico con cui questi induttori innescano la sintesi e il rilascio dei composti volatili non è ancora noto.

CAPITOLO 2

Il sistema tritrofico

pianta ospite – *Liriomyza trifolii* – *Diglyphus isaea*

2.1 Il genere *Liriomyza* Mik

Il genere *Liriomyza* Mik, istituito nel 1894, comprende più di 300 specie, diffuse principalmente nelle zone temperate. Di queste, 23 sono considerate seriamente dannose dal punto di vista economico potendo causare, attraverso la loro attività di minatrici fogliari, ingenti danni a piante coltivate e ornamentali (Spencer, 1973). Le specie sono quasi tutte monofaghe, eccezione fatta per *L. bryoniae*, *Liriomyza strigata* (Meigen), *L. trifolii*, *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard) e *L. sativae*, che al contrario possono compiere il loro ciclo biologico su diverse specie vegetali.

2.2 *Liriomyza trifolii*

2.2.1 Sistematica, distribuzione e piante ospiti

Questa specie è stata descritta per la prima volta nel 1880 come *Oscinis trifolii* da Burgess, che la rinvenne su trifoglio negli Stati Uniti d'America e inclusa nel genere *Liriomyza* da Mik De Meijere nel 1925 (Del Bene, 1984).

A partire dai primi anni ottanta è stata segnalata anche in Europa, introdotta probabilmente attraverso talee di gerbera e crisantemo. In Italia ha fatto la sua comparsa nel 1978, anno in cui fu avvistata in Liguria per la prima volta (Arzone 1979). Successivamente Quaglia (1980) ne ha segnalato la presenza in Toscana e

Lazio, mentre Calabretta e Firullo (1983) in serre del ragusano. In Emilia-Romagna i primi danni su gerbera sono stati segnalati a partire dagli anni '80 (Benuzzi e Nicoli, 1988).

L. trifolii è una specie estremamente polifaga. Può infatti attaccare 45 generi diversi di piante, il 40% delle quali appartengono alle Composite ed il 15% alle Leguminose (Spencer, 1973).

2.2.2 Morfologia e biologia

L'adulto di *L. trifolii* misura circa 2 mm e presenta una livrea giallo-nera. Il capo, la parte inferiore di torace e addome, le zampe e lo scutello sono di un bel giallo brillante, mentre le restanti parti si presentano grigio-nerastre (fig. 2.1 A). I maschi sono leggermente più piccoli delle femmine (Parrella, 1983).

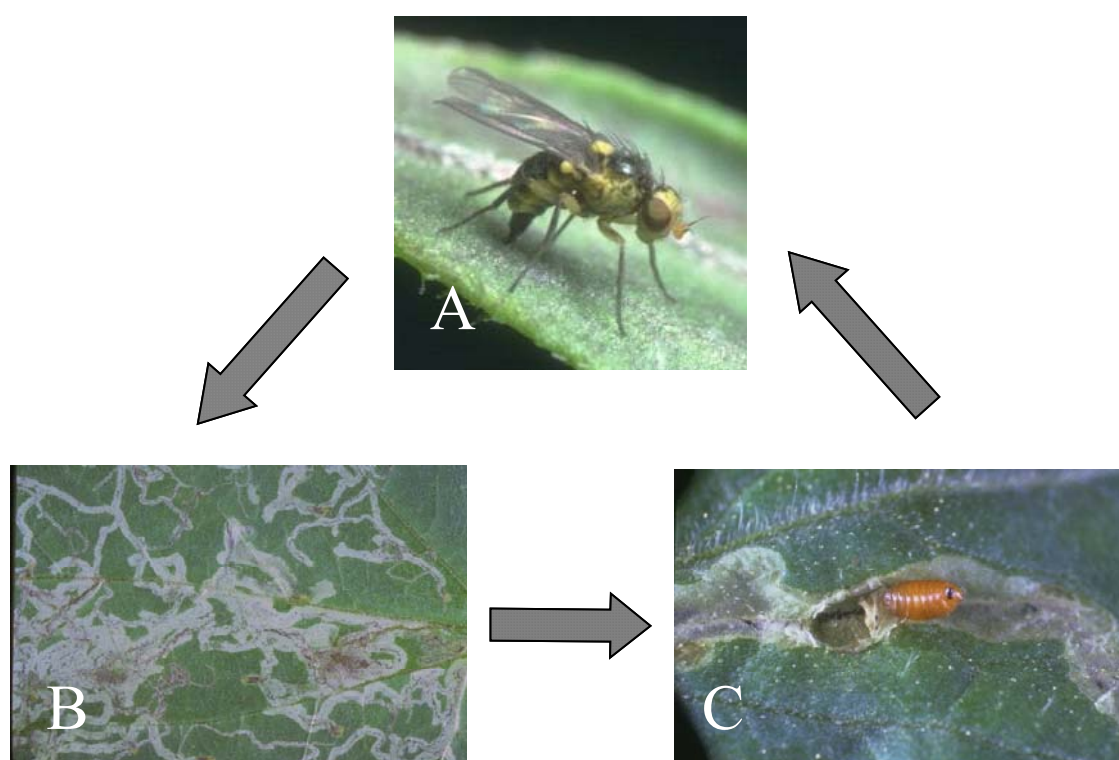


Figura 2.1 Schema del ciclo biologico di *Liriomyza trifolii*. A, adulto; B, larva; C, pupario.

Lo sfarfallamento e l'accoppiamento avvengono al mattino ed una sola copula è sufficiente a fecondare tutte le uova.

Le femmine adulte incidono con l'ovopositore l'epidermide delle foglie, praticando delle lacerazioni che servono sia per l'alimentazione che per l'ovideposizione (fig. 2.1 A). Le punture di ovideposizione sono piccole e di forma tubolare, quelle di alimentazione sono più grandi e a forma di ventaglio (Parrella, 1987). Gli adulti si nutrono principalmente dei succhi cellulari che fuoriescono dalle lacerazioni fogliari e, in misura minore, del nettare dei fiori e della melata prodotta dagli afidi (Charlton e Allen, 1981). Entrambe le fonti alimentari sono indispensabili per le femmine; le proteine, presenti nei succhi cellulari, consentono la maturazione degli oociti (Spencer, 1973), mentre le sostanze zuccherine, presenti nella melata, incrementano la produzione di uova (Zoebisch e Schuster, 1987). I maschi, incapaci di perforare la superficie fogliare, si nutrono della linfa che fuoriesce dalle lacerazioni praticate dalle femmine.

L'ovideposizione avviene principalmente a livello della superficie fogliare superiore e il numero di uova deposte è strettamente dipendente dalla temperatura (Leibee, 1984; Parrella, 1984; Minkenberg, 1990; Olivera *et al.*, 1993) e dalla pianta ospite (Parrella, 1983).

Dall'uovo sguscia una larva incolore, che a maturità diviene giallo brillante (fig. 2.1 B). Essa presenta un capo, 3 segmenti toracici, 8 segmenti addominali, uncini boccali ad una estremità e spiracoli respiratori dall'altra. *L. trifolii* trascorre tutto il proprio stato larvale all'interno di una galleria scavata nel mesofillo fogliare, nutrendosi del tessuto a palizzata (Parrella *et al.*, 1985), da cui emerge solo al completamento del terzo stadio larvale, praticando un'apertura semilunare nell'epidermide superiore della foglia. Trascorse dalle 2 alle 4 ore dall'uscita della larva, si ha la formazione del pupario (fig. 2.1 C) (Leibee, 1984). *L. trifolii* è solita impuparsi nel terreno o, nel caso di forti infestazioni, anche sulla foglia stessa (Del Bene, 1984). I pupari, inizialmente di colore giallo-arancio, imbruniscono leggermente in prossimità dello sfarfallamento.

La durata complessiva del ciclo biologico dipende strettamente dalla temperatura e dalla pianta ospite (Charlton e Allen, 1981; Leibee, 1984; Miller e Isger, 1985; Minkenberg, 1990; Lanzoni *et al.*, 2002).

La sex-ratio è generalmente equilibrata. Gli adulti possono vivere, a seconda della temperatura, dai 15 ai 30 giorni. Le femmine sono in genere più longeve dei maschi (Parrella, 1987).

Nelle serre riscaldate *L. trifolii* è presente ed attiva tutto l'anno, mentre nelle serre fredde compie 4 generazioni da aprile a novembre, svernando come larva in lento accrescimento o come pupa nel terreno. In pieno campo compie 2-3 generazioni a partire da giugno e sverna come pupa (Tranfaglia e Arpaia, 1988).

2.2.3 Ecologia chimica

In saggi biologici, condotti in laboratorio utilizzando un olfattometro a Y, sono state analizzate le risposte comportamentali di femmine adulte di *L. trifolii* a piante di fagiolo indenni, su cui il fitofago viene allevato, piante danneggiate da conspecifici (punture di nutrizione e larve) e piante danneggiate artificialmente. L'obiettivo era studiare il comportamento di ricerca della pianta ospite da parte di questo fitofago e analizzare l'effetto di piante infestate da conspecifici sul comportamento del minatore (Bazzocchi *et al.*, 2005).

È risaputo infatti che per alcuni fitofagi l'effetto di piante già infestate può essere repulsivo: *S. exigua* (Turlings e Tumlinson, 1991), *Pieris rapae* (L.) (Sato *et al.*, 1999) e *Heliothis virescens* (F.) (de Moraes *et al.*, 2001), mentre, in altri casi, la presenza del fitofago sulla pianta può avere sugli individui della stessa specie un effetto attrattivo: *Popillia japonica* Newman (Loughrin *et al.*, 1995), *Plutella xylostella* (L.) (Shiojiri e Takabayashi, 2003).

Dall'analisi dei risultati ottenuti si è potuto constatare che le piante di fagiolo infestate da individui della stessa specie (sia allo stato di adulto: punture di nutrizione, che di larva: foglie minate) attraggono le femmine di *L. trifolii* molto più

di quanto non facciano le piante indenni o danneggiate meccanicamente (Bazocchi *et al.*, 2005).

A questo riguardo Loughrin *et al.* (1995) riportano che adulti di *Popillia japonica* Newman risultano più attratti da foglie di melo selvatico danneggiate da conspecifici che da foglie indenni o danneggiate artificialmente, attribuendo questo comportamento a differenti cause. L'utilizzo di composti volatili, prodotti dalla pianta ospite come conseguenza dell'azione di nutrizione del fitofago, faciliterebbe l'accoppiamento e la localizzazione della pianta ospite. Inoltre, sempre secondo gli stessi Autori, questi composti volatili sarebbero utilizzati da *P. japonica* come indicatori dell'adeguatezza della pianta ospite. Anche *P. japonica* infatti, come *L. trifolii*, è una specie estremamente polifaga che può nutrirsi a discapito di circa 300 specie vegetali (Fleming, 1972). Shiojiri e Takabayashi (2003) hanno ritrovato in *Plutella xylostella* (L.) un comportamento molto simile a quello di *L. trifolii*. Piante di cavolo infestate da individui della stessa specie attraggono le femmine di *P. xylostella* molto più di quanto non facciano quelle non infestate. Per cercare di comprendere il comportamento di *P. xylostella*, Shiojiri e Takabayashi (2003) hanno analizzato attentamente quello del suo limitatore naturale *Cotesia plutellae* Kurdjumov, giungendo ad un sorprendente risultato. Femmine di *C. plutellae*, attratte da piante di cavolo infestate da *P. xylostella*, parassitizzano in media sempre lo stesso numero di larve ospiti (1,4), a prescindere dal loro numero sulla pianta. Dunque il comportamento di *P. xylostella* potrebbe essere un adattamento messo a punto per ridurre il rischio di parassitizzazione. Se questa ipotesi può spiegare il comportamento di *P. xylostella* e del suo limitatore naturale, non sembra in grado di giustificare quello di *L. trifolii* e di *D. isaea* che, oltre a svolgere una consistente azione di predazione sulle larve del minatore (*host-feeding*) (Nicoli e Pitrelli, 1993), ha percentuali di parassitizzazione ben maggiori che si ripercuotono pesantemente sulla popolazione del fitofago.

Del Piccolo *et al.* (2007) hanno condotto una serie di saggi biologici per verificare la presenza in *L. trifolii* di attrattivi sessuali agenti a breve o lungo raggio.

Dall'analisi dei risultati ottenuti sembra che a svolgere un ruolo attivo durante l'accoppiamento siano degli idrocarburi cuticolari presenti sulla femmina, agenti a breve distanza. Le analisi gas-cromatografiche degli estratti cuticolari di entrambi i sessi hanno evidenziato la presenza di idrocarburi a medio-lunga catena, con differenze quantitative tra maschio e femmina.

2.2.4 Importanza economica

I danni causati da *L. trifolii* sono sostanzialmente di due tipi (Minkenberg, 1990):

1) danni diretti, provocati prima dalle femmine adulte mediante le punture di alimentazione e ovideposizione, poi dalle larve che scavano nel mesofillo fogliare. Il risultato è una riduzione del potenziale fotosintetico e spesso un disseccamento della foglia, che si ripercuote sul valore commerciale delle specie ortive ed ornamentali;

2) danni indiretti, dovuti all'ingresso di funghi e batteri attraverso le lesioni provocate dagli adulti e attraverso le gallerie scavate dalle larve. Inoltre gli adulti possono trasmettere alcune virosi come il virus del mosaico del sedano (Nicoli *et al.*, 1985) o il virus del mosaico del tabacco (Costa *et al.*, 1958).

Nel Nord America il fitofago è particolarmente dannoso su crisantemo e sedano, in Francia ed Olanda vengono segnalati danni su pomodoro, mentre in Italia attacca soprattutto gerbera e pomodoro (Benuzzi e Nicoli, 1988).

2.3 Parassitoidi di *L. trifolii*

Minkenberg e van Lenteren (1986) indicano come parassitoidi di *L. trifolii* ben 28 specie di Imenotteri appartenenti alle famiglie degli Eulofidi, Braconidi e Pteromalidi. In Italia, tra gli Eulofidi ritroviamo: *D. isaea*, *Chrysonotomyia formosa* (Westwood), *Pediobius* sp., *Pnigalio* sp., (Del Bene, 1984), *Chrysocharis*

pubicornis (Zetterstedt) (Süss, 1985), *Cirrospilus vittatus* (Walker) e *Hemiptarsenus dropion* (Walker) (Del Bene, 1989). Tra i Braconidi: *D. sibirica* e *Opius* spp.

2.4 *Diglyphus isaea*

2.4.1 Sistematica, distribuzione e specie ospiti

Il parassitoide *D. isaea*, descritto inizialmente come *Cirrospilus isaea* (Walker) nel 1983, è un Imenottero Calcidoideo appartenente alla famiglia degli Eulofidi. Di origine paleartica e abbondantemente diffuso in Europa, Nord Africa e Giappone, può ormai essere considerato un insetto cosmopolita, la cui diffusione e il cui utilizzo sono stati favoriti dalla sua efficacia nel contenere le infestazioni di numerosi fillominatori (Benuzzi e Raboni, 1992). Questo ectoparassitoide, lanciato allo stato adulto, è stato segnalato su 18 specie di Agromizidi (Benuzzi e Nicoli, 1988) e persino su larve di Lepidotteri (Boucek e Askew, 1968). La sua efficacia si deve, oltre alla sua elevata capacità di parassitizzazione, anche alla sua abitudine di nutrirsi direttamente delle larve opiti (*host-feeding*) (Nicoli e Pitrelli, 1993).

2.4.2 Morfologia e biologia

L'adulto di *D. isaea* (fig. 2.2 A) è di colore nero con riflessi verdi metallici, di dimensioni variabili da 1 a 2 mm. Il sesso si distingue osservando le tibie delle zampe metatoraciche, che nelle femmine risultano uniformemente nere, mentre nel maschio presentano una banda mediana chiara.

Terminato l'accoppiamento, la femmina inizia la ricerca dell'ospite e, una volta individuata la larva della vittima, prima la immobilizza, inoculando nel suo corpo attraverso l'ovopositore una sostanza paralizzante, poi successivamente la paras-

sitizza, deponendo direttamente sul suo corpo o all'interno della mina fogliare una o più uova, semitrasparenti e leggermente ricurve (fig. 2.2 B), da cui sgusceranno delle larve (fig. 2.2 C) che cominceranno subito a nutrirsi dell'ospite dall'esterno.

Si distinguono tre stadi larvali; la larva neo sgusciata si presenta incolore, ma con il procedere dello sviluppo assume una colorazione nocciola, per divenire verde una volta raggiunta la maturità. È allora che la larva provvede a consolidare la propria camera pupale all'interno della mina, costruendo delle particolari strutture che proteggeranno la pupa da un eventuale disseccamento della foglia (fig. 2.2 D).

La pupa, inizialmente di colore verde (fig. 2.2 D), diviene nera in prossimità dello sfarfallamento dell'adulto, che avviene attraverso un foro circolare praticato nella pagina superiore della foglia.

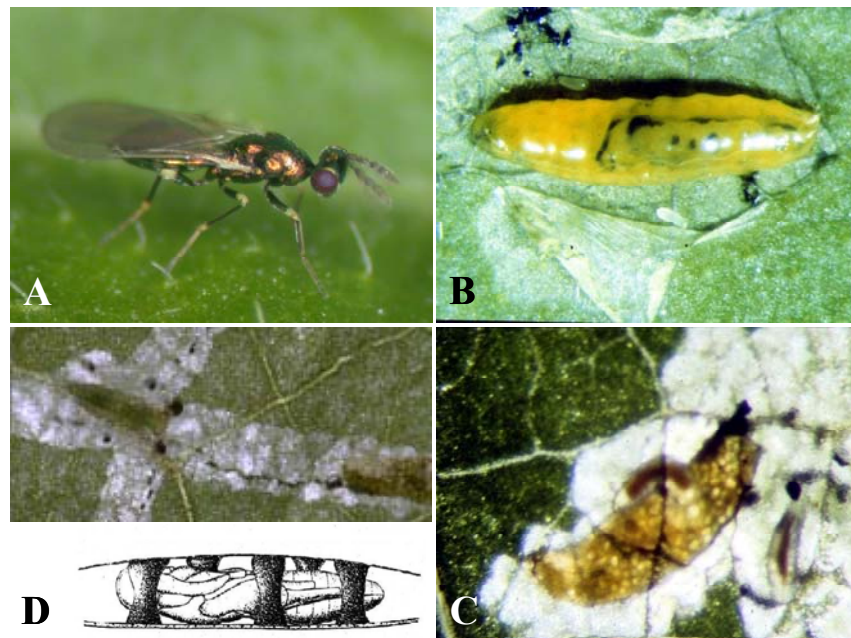


Figura 2.2 Schema del ciclo biologico di *Diglyphus isaea*. A, adulto; B, uovo; C, larva; D, pupa (da Viggiani, 1964).

D. isaea non presenta una diapausa vera e propria e uno stadio specifico adattato allo svernamento, ma è in grado di trascorrere l'inverno in diversi stadi biologici, rallentando i tempi del proprio sviluppo preimmaginale.

Oltre alla parassitizzazione, che è rivolta principalmente a larve di terza età, *D. isaea* è in grado di gravare sulle popolazioni dei propri ospiti predando direttamente le larve (*host-feeding*). Questo comportamento predatorio è riservato nella maggior parte dei casi alle larve più giovani ed è indispensabile per la maturazione degli oociti, oltre che fondamentale dal punto di vista applicativo in quanto permette un controllo di tutti gli stadi larvali dell'ospite (Benuzzi e Raboni, 1992).

2.4.3 Ecologia chimica

Studiando il comportamento di ricerca di *D. isaea*, Finidori-Logli *et al.* (1996) sono arrivati alla conclusione che il parassitoide localizzi le larve ospiti di *L. trifolii* sfruttando i segnali chimici volatili emessi dal complesso pianta-ospite, piuttosto che servirsi dei segnali emessi unicamente dal corpo delle proprie prede, che risultano più attendibili ma che presentano l'inconveniente di essere difficilmente reperibili nell'ambiente. Questo spiegherebbe lo scarso interesse mostrato dal parassitoide nei confronti delle larve e degli estratti ottenuti da piante di fagiolo indenni e, al contrario, la notevole attrazione mostrata per le miscele estratte da piante infestate dal minatore.

Partendo da queste premesse Zhao e Kang (2002) hanno analizzato all'elettroantennogramma le risposte di *D. isaea* a varie tipologie di piante, per cercare di chiarire se e quale ruolo possano avere durante la localizzazione dell'ospite *L. sativae*. Solo le foglie infestate da larve di *L. sativae* hanno avuto l'effetto di indurre nell'antenna del parassitoide delle risposte rilevabili, benché sempre di intensità inferiore a quelle indotte dalle piante danneggiate meccanicamente. L'effetto delle foglie indenni e di quelle minate (senza larve) non si è

mai discostato in maniera significativa da quello indotto dal semplice controllo (aria purificata), sia che ad essere analizzate fossero piante ospiti del fitofago che non ospiti.

2.4.4 Ricerca dell'ospite da parte di *D. isaea*: lo stato dell'arte

Nel corso degli anni 2000-2004 è stato condotto uno studio per cercare di approfondire il ruolo svolto dai semiochimici nell'interazione tritrofica che vedeva coinvolti il dittero fillominatore *L. trifolii*, il parassitoide *D. isaea* e piante di fagiolo (*P. vulgaris*) (Bazzocchi e Maini, 2000; Bazzocchi *et al.*, 2005).

In prove condotte in laboratorio utilizzando un olfattometro a Y sono state sottoposte al parassitoide delle piante di fagiolo indenni, danneggiate artificialmente, infestate da *L. trifolii* (punture di nutrizione e larve) e la parte indenne di piante infestate dal fitofago. Lo scopo era capire quali tra le fonti saggiate risultassero attrattive, di confrontare l'effetto di un danno generico con uno specifico dovuto all'azione di *L. trifolii*, di verificare l'esistenza nella pianta danneggiata dal fitofago di un'emissione sistemica e di analizzare il suo effetto sul comportamento del parassitoide.

Dall'analisi dei risultati ottenuti si è potuto constatare come il parassitoide risulti attratto dalle piante attaccate dal fitofago (sia allo stato di adulto: punture di nutrizione, che di larva: foglie minate), non mostrando alcuna attrazione per quelle danneggiate artificialmente. Il danno del fitofago è risultato il fattore determinante che ha innescato il rilascio di caïromoni, utilizzati da *D. isaea* durante il processo di localizzazione del suo ospite e l'emissione non ha interessato solo le porzioni direttamente attaccate dal fitofago, ma ha coinvolto l'intera pianta (emissione sistemica).

Resta però ancora da chiarire quali siano i composti biologicamente attivi in grado di influenzare il comportamento di ricerca del parassitoide.

2.5 Obbiettivo della ricerca

Scopo del presente studio è stato identificare le sostanze responsabili dell'attrazione del parassitoide *D. isaea* da parte di piante di fagiolo infestate da *L. trifolii* e individuare le sostanze biologicamente attive, al fine di poterle in futuro impiegare per attirare il parassitoide e migliorare, di conseguenza, la lotta biologica in campo a questo insetto dannoso.

CAPITOLO 3

Materiali e metodi

3.1 Materiale biologico

Le piante di fagiolo (*P. vulgaris*, cv. borlotto lingua di fuoco nano) venivano fatte crescere singolarmente in vasetti di vetro ($\varnothing=4,5$ cm) all'interno di un armadio climatizzato (fotoperiodo L:D = 16:8; temperatura: 25 ± 1 °C; UR: 60 ± 10 %) e utilizzate una volta completato lo sviluppo delle foglie post-cotiledonari (approssimativamente dopo 2 settimane).

Il parassitoide *D. isaea* veniva acquistato presso la biofabbrica Bioplanet di Cesena, dove viene allevato su *L. trifolii* sviluppata su fagiolo. Gli insetti venivano isolati all'interno di provette, sessati, nutriti con miele e riposti all'interno di un armadio climatizzato (temperatura: 12 ± 1 °C) in attesa di essere saggiati. Tutti i parassitoidi impiegati nei saggi biologici erano femmine inesperte di 2-4 giorni di età.

3.2 Olfattometro

Per studiare le risposte comportamentali di *D. isaea* è stato utilizzato un olfattometro a due vie o a Y (fig. 3.1 A). Un flusso di aria (2 L/min di aria nel punto di rilascio dell'insetto, 1 L/min in ciascun braccio del tubo a Y), generato da una pompa e regolato attraverso due flussimetri, veniva fatto passare attraverso una trappola a carboni attivi e una beuta contenente acqua distillata. L'aria, una volta purificata e umidificata, attraversava le due "camere degli odori", costituite da due ampole di vetro (L = 10 cm, $\varnothing = 1,2$ cm) chiuse da tappi muniti di setti in

silicone/teflon, dove erano inserite le strisce di carta da filtro, che venivano sostituite ad ogni replica e su cui venivano applicate le soluzioni da saggiare. Successivamente l'aria giungeva al tubo a Y, dove venivano analizzate le risposte comportamentali degli insetti.

Il piano d'appoggio era rivestito di carta bianca per consentire alla luce di diffondersi in maniera uniforme; la fonte di illuminazione era rappresentata da una lampada (intensità della luce: 700 lux) posta ad un'altezza di circa 1 m dal piano di appoggio dell'olfattometro e posizionata sul tubo a Y in modo da non influenzare la scelta degli insetti.

3.2.1 Procedura sperimentale e valutazione delle scelte

La procedura di valutazione dei dati comportamentali, utilizzata nella presente ricerca, è la stessa impiegata da un gran numero di autori (Sabelis e van de Baan, 1983; Steinberg *et al.*, 1992; Potting *et al.*, 1995; Du *et al.*, 1996; Ngi-Song *et al.*, 1996; Bertschy *et al.*, 1997; Bernasconi *et al.*, 1998; Hern e Dorn, 1999).

Ad ogni saggio, una femmina del parassitoide veniva introdotta nel tubo a Y a livello del punto di rilascio (fig. 3.1 B). Se, entro 5 minuti dall'introduzione, l'insetto non raggiungeva la biforcazione del tubo, gli veniva attribuita una "non scelta". Se, al contrario, entro il tempo stabilito, percorreva tutta la prima parte del tubo (area di "non scelta") raggiungendo la biforcazione, si registrava il braccio scelto per primo ("prima scelta") e si concedevano all'insetto fino ad 8 minuti totali (a partire dalla sua introduzione nel tubo a Y) per compiere una "scelta definitiva" e raggiungere l'estremità di uno dei due bracci dell'olfattometro. Nella valutazione delle scelte, si è deciso di tenere conto solo di quelle "definitive" e non delle "prime scelte", poiché solo alle estremità dei bracci le fonti di odore sono veramente separate tra loro. A livello della biforcazione, infatti, si creano turbolenze che portano al mescolamento degli odori (van Alphen e Jervis, 1996).

Le fonti di odore e le strisce di carta da filtro su cui venivano applicate erano sostituite ad ogni saggio.

Al termine di ciascuna prova sperimentale tutta la vetreria (il tubo a Y e le ampolle di vetro) veniva accuratamente lavata con detergente e risciacquata con acqua distillata.

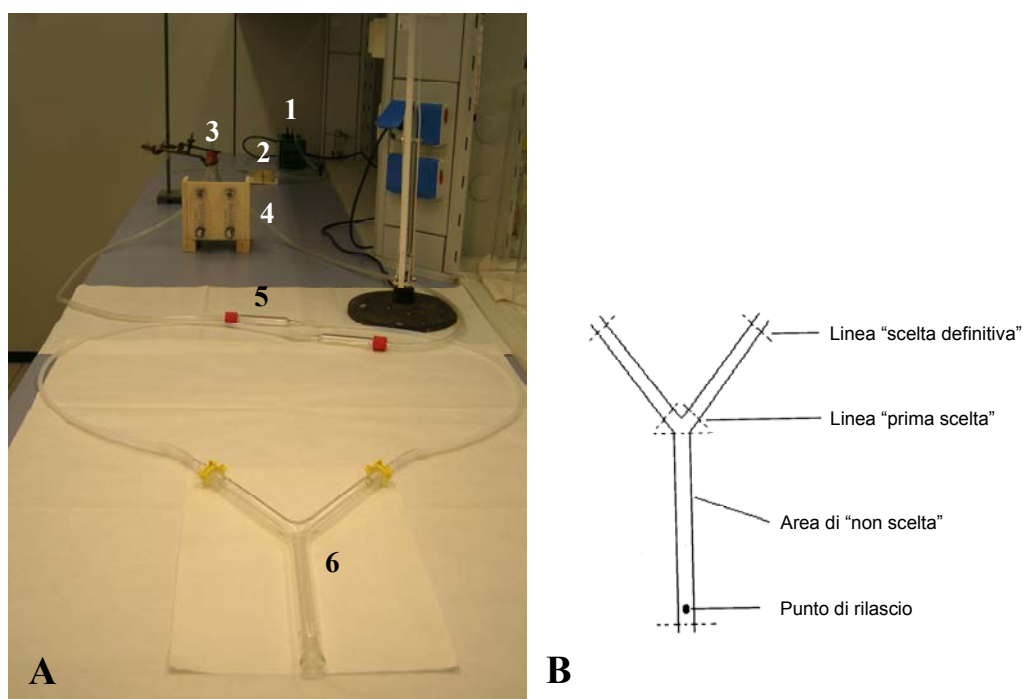


Figura 3.1 A, olfattometro a due vie utilizzato nei saggi biologici. 1, pompa; 2, trappola a carboni attivi; 3, beuta con acqua distillata; 4, flussimetri; 5, camere degli odori; 6, tubo a Y. B, suddivisione funzionale del tubo a Y.

3.3 Fonti di odore analizzate

Le fonti di odore analizzate sono state:

- 1) *piante di fagiolo indenni*;
- 2) *piante di fagiolo con larve di terza età L. trifolii* : piante sottoposte a 2 ore di infestazione e utilizzate quando il fitofago raggiungeva il terzo stadio larvale (dopo 5 giorni a $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$: Lanzoni *et al.*, 2002);

3) *piante danneggiate meccanicamente*: piante su cui, prima dell'utilizzo, venivano praticate delle microlesioni sulle foglie mediante uno spillo entomologico (n. 30 microlesioni per foglia);

4) *testimone* = *vaso* + *torba*.

3.4 Campionamento ed estrazione dei composti volatili presenti nello spazio di testa dei campioni

3.4.1 Metodologia di analisi statica: tecnica dell'SPME

La microestrazione in fase solida (SPME) è una tecnica che permette di estrarre e concentrare, impiegando fibre di silice rivestite da polimeri con elevate capacità adsorbenti (fase stazionaria), una vasta serie di composti organici volatili o semi volatili da differenti matrici come aria, acqua e suolo (Zhang e Pawliszyn, 1993). Ideata per campionare i contaminanti organici presenti nell'acqua, questa tecnica è stata successivamente impiegata in numerose altre analisi ambientali (Steffen e Pawliszyn, 1996) e nello studio dei feromoni degli insetti (Malosse *et al.*, 1995). È una tecnica semplice, dove l'esito dell'estrazione è fortemente legato alla polarità del composto che si vuole estrarre e alla scelta della fibra e dell'adsorbente con cui è rivestita; le fibre in polidimetilsilossano sono comunemente impiegate per campionare i soluti non polari, mentre quelle in poliacrilato per estrarre i composti polari (Vercammen *et al.*, 2000).

Le piante di fagiolo (indenni o infestate dal fillominatore) venivano confinate all'interno di un cristallizzatore (h = 13 cm; Ø = 10 cm), chiuso ermeticamente e munito di un tappo con un setto perforabile in silicone/teflon. Trascorsi 20 minuti (tempo atteso per consentire alle sostanze volatili di diffondersi nel contenitore), il dispositivo dell'SPME perforava il setto e la fibra era esposta allo spazio di testa del campione per 45 minuti (fig. 3.2), trascorsi i quali veniva ritratta e succes-

sivamente introdotta nell'iniettore del gascromatografo ($T = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$), dove i composti assorbiti venivano rilasciati per deassorbimento termico.

La fibra SPME utilizzata era in polidimetilsilossano, lo spessore della fase stazionaria era di $100\text{ }\mu\text{m}$.

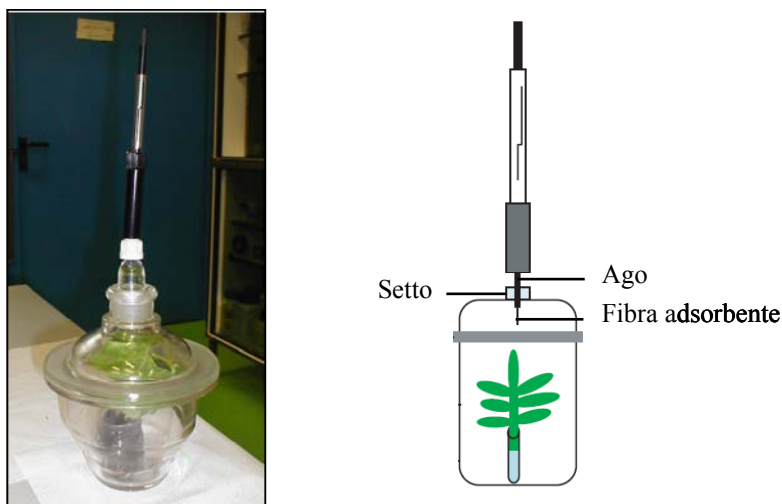


Figura 3.2 Tecnica dell'SPME (da Tholl *et al.*, 2006).

3.4.2 Metodologia di analisi dinamica: tecnica dell'*Air Entrainment*

È una tecnica impiegata in ecologia chimica per identificare e quantificare i semiochimici volatili presenti nello spazio di testa di un campione (Agelopoulos e Pickett, 1998); si tratta di una tecnica “dinamica” in quanto l'aria fluisce continuamente sul campione veicolando le sostanze volatili sull'adsorbente e presenta, rispetto alla tecnica SPME ed ad altre tecniche analoghe, il vantaggio di poter assorbire i composti volatili emessi durante un lasso di tempo che può essere anche molto lungo. In questo caso, il campione viene confinato all'interno di una camera chiusa ermeticamente e viene attraversato da un gas vettore (generalmente aria purificata). I composti volatili emessi sono trasportati dal gas fino ad una cartuccia adsorbente, impaccata con un polimero poroso, dove sono assorbiti e preconcentrati. Il deassorbimento dei composti dalla cartuccia (estrazione) può essere

ottenuto mediante eluizione con un solvente (deassorbimento mediante solvente) o trattamento rapido mediante calore (deassorbimento termico) (Agelopoulos e Pickett, 1998).

Ad ogni campionamento, 3 piante di fagiolo (indenni, infestate dal fitofago o danneggiate meccanicamente) venivano confinate in un recipiente di vetro (h = 40 cm; Ø = 12 cm), chiuso da un tappo a tenuta in polietilene. Un flusso di aria (400 ml/min), purificata mediante un filtro molecolare e un filtro a carboni attivi, veniva fatta passare sopra i campioni e, successivamente, attraverso una cartuccia adsorbente contenente 100 mg di Porapak Q (mesh 50-80; Alltech) (fig. 3.3). L'estrazione durava 15 ore ed è stata replicata, per ogni tipologia di fonte di odore analizzata, 5 volte. Il deassorbimento dei composti dalla cartuccia avveniva mediante eluizione con dietil etere (1 ml). Gli estratti ottenuti erano concentrati sotto flusso di azoto e conservati a -20°C, in attesa di essere analizzati e saggiati.

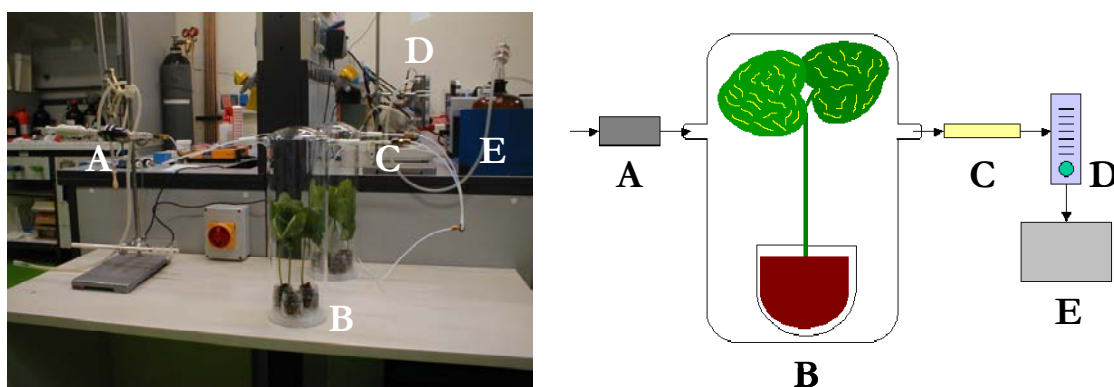


Figura 3.3 Tecnica di assorbimento delle sostanze volatili rilasciate dai campioni. A, filtro molecolare e filtro a carboni attivi; B, recipiente di vetro in cui venivano confinate le piante; C, cartuccia adsorbente; D, flussimetro; E, pompa aspirante.

3.4.2.1 Saggi biologici con gli estratti

Da ogni ciclo di estrazione si ottenevano due miscele, ovvero un estratto di fagioli indenni e un estratto di piante infestate dal minatore, che venivano saggiati successivamente all'olfattometro a Y (tab. 3.1).

3.4.3 Analisi dei composti volatili

I composti volatili campionati sono stati analizzati e identificati mediante un gascromatografo Varian 3400 collegato ad uno spettrometro di massa Varian Saturn 2000. Il gascromatografo era equipaggiato con una colonna CP-SIL 8; 30 m x 0,25 mm ID. Il programma di analisi prevedeva una temperatura iniziale di 40°C che veniva mantenuta per un minuto per poi salire a 320°C a 10°C/min. Il gas di trasporto era elio, il flusso in colonna 1 ml/min.

Tabella 3.1 Schema delle prove condotte all'olfattometro a Y con gli estratti.

Prove sperimentali	Olfattometro a Y		Femmine di <i>D. isaea</i> saggiate (n)
	Braccio 1	Braccio 2	
1	20 µl S ₁	20 µl L III ₁	10
2	20 µl S ₂	20 µl L III ₂	10
3	20 µl S ₃	20 µl L III ₃	12
4	20 µl S ₄	20 µl L III ₄	10
5	20 µl S ₅	20 µl L III ₅	15

S, estratti di piante di fagiolo indenni

L III, estratti di piante di fagiolo infestate da *Liriomyza trifolii*

3.5 Isolamento dei composti biologicamente attivi

3.5.1 Tecnica della cromatografia liquido-solido (LC)

La cromatografia liquida su colonna è un processo di separazione basato sulla distribuzione differenziale dei componenti di una miscela tra una fase mobile liquida, rappresentata da un solvente organico e una fase stazionaria solida, rappresentata da un adsorbente finemente suddiviso con cui è impaccata la colonna. I composti della miscela, assorbiti selettivamente sulla superficie del solido, ven-

gono eluiti dalla fase stazionaria aumentando progressivamente la polarità della fase mobile.

Il processo di estrazione avveniva con la stessa procedura descritta nel paragrafo 3.4.2 (*Tecnica Air Entrainment*) ed è stato replicato 2 volte. L'estratto ottenuto era concentrato sotto flusso di azoto e caricato su una colonna ottenuta impacchando una pipetta Pasteur con 200 mg di silice (mesh 200-400; 60Å). La colonna veniva prima eluita con 2 ml di esano (F_1) e successivamente con 2 ml di etere (F_2) (fig. 3.4). Le frazioni ottenute erano successivamente concentrate sotto flusso di azoto e saggiate all'olfattometro a Y.

3.5.1.1 Saggi biologici con le frazioni F_1 e F_2

Le frazioni F_1 e F_2 , ottenute mediante cromatografia liquido-solido degli estratti di piante di fagiolo infestate da *L. trifolii*, sono state saggiate contro i rispettivi solventi (tab. 3.2), allo scopo di individuare la frazione della miscela contenente i composti biologicamente attivi in grado di influenzare il comportamento di ricerca del parassitoide. Inizialmente sono state condotte due prove preliminari per valutare gli effetti dei solventi impiegati nelle eluizioni (etere; esano).

Tabella 3.2 Prove sperimentali con le frazioni F_1 e F_2 .

Prove sperimentali	Olfattometro a Y		Femmine di <i>D. isaea</i> saggiate (n)
	Braccio 1	Braccio 2	
1	20 µl ESANO	20 µl ESANO	50
2	20 µl ESANO	20 µl F_1	42
3	20 µl ETERE	20 µl ETERE	50
4	20 µl ETERE	20 µl F_2	46

F_1 , frazioni contenenti i composti apolari dell'estratto attivo
 F_2 , frazioni contenenti i composti polari dell'estratto attivo

3.6 Ruolo biologico dei composti identificati

3.6.1 Saggi con i composti puri

Una volta identificati i composti volatili correlabili all'attività trofica di *L. trifolii*, per individuare quali sostanze vengano impiegate dal parassitoide *D. isaea* durante la ricerca del proprio ospite, si è ritenuto di procedere saggiando tutti i composti (tab. 3.3), eccetto l'acetato di 3-esenile che risulta essere rilasciato abbondantemente anche dalle piante danneggiate meccanicamente, che nei saggi *in vivo* non erano risultate attrattive nei confronti del parassitoide (Bazzocchi e Maini, 2000).

Tabella 3.3 Saggi biologici con i composti puri.

Prove sperimentali	Olfattometro a Y		Femmine <i>D. isaea</i> saggate (n)
	Braccio 1	Braccio 2	
1	20 µl ETERE	1 ng INDOLO / 20 µl ETERE	50
2	20 µl ETERE	10 ng INDOLO / 20 µl ETERE	50
3	20 µl ETERE	100 ng INDOLO / 20 µl ETERE	50
4	20 µl ETERE	1 ng α COPAENE / 20 µl ETERE	50
5	20 µl ETERE	10 ng α COPAENE / 20 µl ETERE	50
6	20 µl ETERE	100 ng α COPAENE / 20 µl ETERE	50
7	20 µl ETERE	1 ng β CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50
8	20 µl ETERE	10 ng β CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50
9	20 µl ETERE	100 ng β CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50
10	20 µl ETERE	1000 ng β CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50
11	20 µl ETERE	1 ng α CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50
12	20 µl ETERE	10 ng α CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50
13	20 µl ETERE	100 ng α CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50
14	20 µl ETERE	1 ng α FARNESENE / 20 µl ETERE	50
15	20 µl ETERE	10 ng α FARNESENE / 20 µl ETERE	50
16	20 µl ETERE	100 ng α FARNESENE / 20 µl ETERE	50

Alcuni di questi composti non sono disponibili in commercio (ocimene; DMNT; esadecene). Quelli reperibili (indolo; α copaene; β cariofillene; α cariofillene; α farnesene) sono stati diluiti in etere e saggiati su 50 femmine inesperte di *D. isaea* a 3 diverse concentrazioni (1 ng; 10 ng; 100 ng)/20 μ l etere secondo lo schema riportato in tabella 3.3.

3.7 Analisi statistica dei dati

Ai fini dell'elaborazione statistica dei dati, sono stati presi in considerazione solo gli insetti che hanno effettuato una scelta definitiva. Le scelte operate all'olfattometro a Y dalle femmine di *D. isaea* sono state valutate attraverso il test χ^2 "frequenze osservate vs frequenze attese".

CAPITOLO 4

Risultati

4.1 Analisi e identificazione dei composti volatili presenti nello spazio di testa dei campioni

4.1.1 Composti volatili estratti attraverso la tecnica dell'SPME

La figura 4.1 mostra i cromatogrammi di piante di fagiolo indenni e piante infestate da larve di *L. trifolii*, ottenuti analizzando lo spazio di testa dei campioni attraverso la tecnica statica dell'SPME. Dall'analisi e dal confronto dei cromatogrammi di entrambi i campioni è stato possibile isolare quattro composti (tab. 4.1), che sembrerebbero essere rilasciati abbondantemente dalle piante di fagiolo danneggiate dal fitofago ed emessi solo in tracce dalle piante indenni.

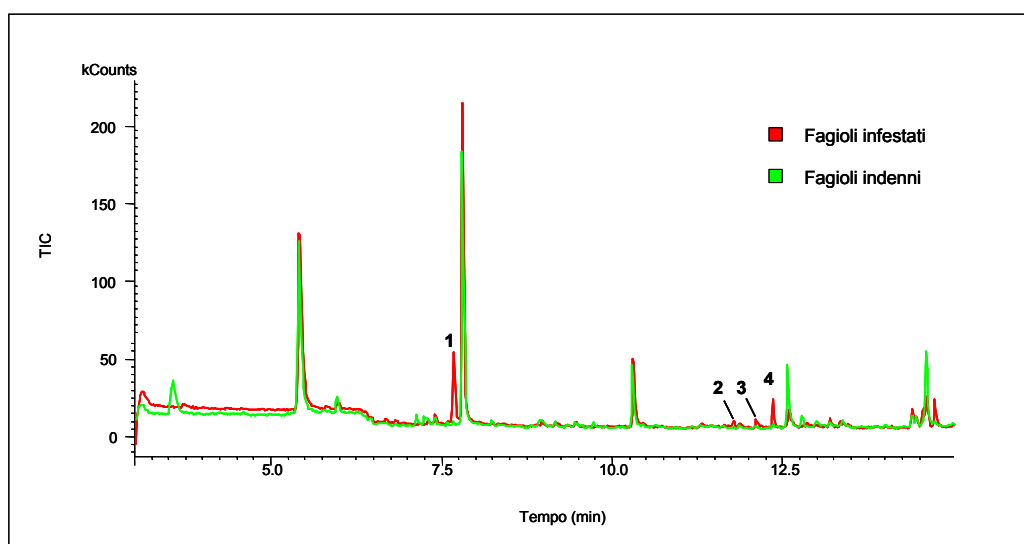


Figura 4.1 Confronto dei profili gas-cromatografici ottenuti da piante di fagiolo indenni e piante infestate da larve di *L. trifolii*. In ordinata la corrente ionica totale.

Tabella 4.1 Identificazione dei composti volatili emessi da piante di fagiolo infestate da *L. trifolii* campionati mediante la tecnica dell'SPME (il numero d'ordine corrisponde a quello della fig. 4.1).

N °	Tempo di ritenzione (min)	Composto	Formula
1	7,634	Cicloesano, 2 etenil - 1,1 - dimetil - 3 metilene	C ₁₁ H ₁₈
2	11,733	Tetradecene	C ₁₄ H ₂₈
3	12.067	Dodecanale	C ₁₂ H ₂₄ O
4	12,323	β -cariofillene	C ₁₅ H ₂₄


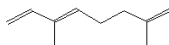
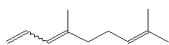
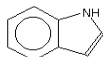

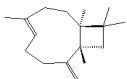
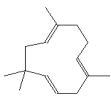
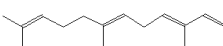
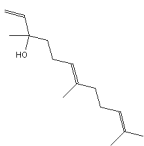

4.1.2 Composti volatili estratti attraverso la tecnica dell'Air Entrainment

L'analisi degli estratti ottenuti da piante di fagiolo indenni, da piante infestate da larve di *L. trifolii* e da piante danneggiate meccanicamente e il confronto dei relativi cromatogrammi ha rivelato una profonda differenza nei profili gas-cromatografici dei campioni analizzati, sia a livello qualitativo che quantitativo (fig. 4.2). Confrontando i profili gas-cromatografici di tutti i campioni analizzati (piante di fagiolo indenni, piante infestate dal fitofago, piante danneggiate artificialmente, vaso + torba) è stato possibile individuare, per differenza, i composti volatili imputabili, con buona probabilità, al semplice danno meccanico e al danno conseguente all'attività trofica dell'agromizide (tab. 4.2).

Da un lato, il danno compiuto dalle larve del fitofago attraverso l'attività di nutrizione induce nelle piante di fagiolo un abbondante rilascio di composti che generalmente non sono emessi dalle piante indenni. Si tratta principalmente di alcoli a catena breve e terpenoidi volatili (ocimene; β -cariofillene; 4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene). D'altro canto, alcuni composti, generalmente assenti o emessi solo in tracce dalle

piante di fagiolo indenni, subiscono a seguito dell'infestazione un notevole incremento e vengono rilasciati in quantità particolarmente elevate. È il caso dell'acetato di 3-esenile, un composto emesso in quantità notevoli dalle piante infestate, ma rilasciato abbondantemente anche da quelle danneggiate meccanicamente (fig. 4.2).

Tabella 4.2 Identificazione dei composti volatili emessi da piante di fagiolo infestate da larve di *L. trifolii* campionati mediante la tecnica dell'Air Entrainment; in arancione sono indicati i composti imputabili al danno compiuto dal fitofago, in verde quelli generici da stress. Il numero d'ordine dei composti è lo stesso della fig. 4.2.

N °	Tempo di ritenzione (min)	Composto	Formula	Struttura chimica
1	5,9	Acetato di 3 esenile	$C_8H_{14}O_2$	
2	6,5	Ocimene	$C_{10}H_{16}$	
3	7,6	DMNT	$C_{11}H_{18}$	
4	10,7	Indolo	C_8H_7N	
5	11,6	α -copaene	$C_{15}H_{24}$	
6	12,3	β -cariofillene	$C_{15}H_{24}$	
7	12,8	α -cariofillene	$C_{15}H_{24}$	
8	13,3	α -farnesene	$C_{15}H_{24}$	
9	14,0	Nerolidolo	$C_{15}H_{26}O$	
10	14,3	Esadecene	$C_{16}H_{32}$	

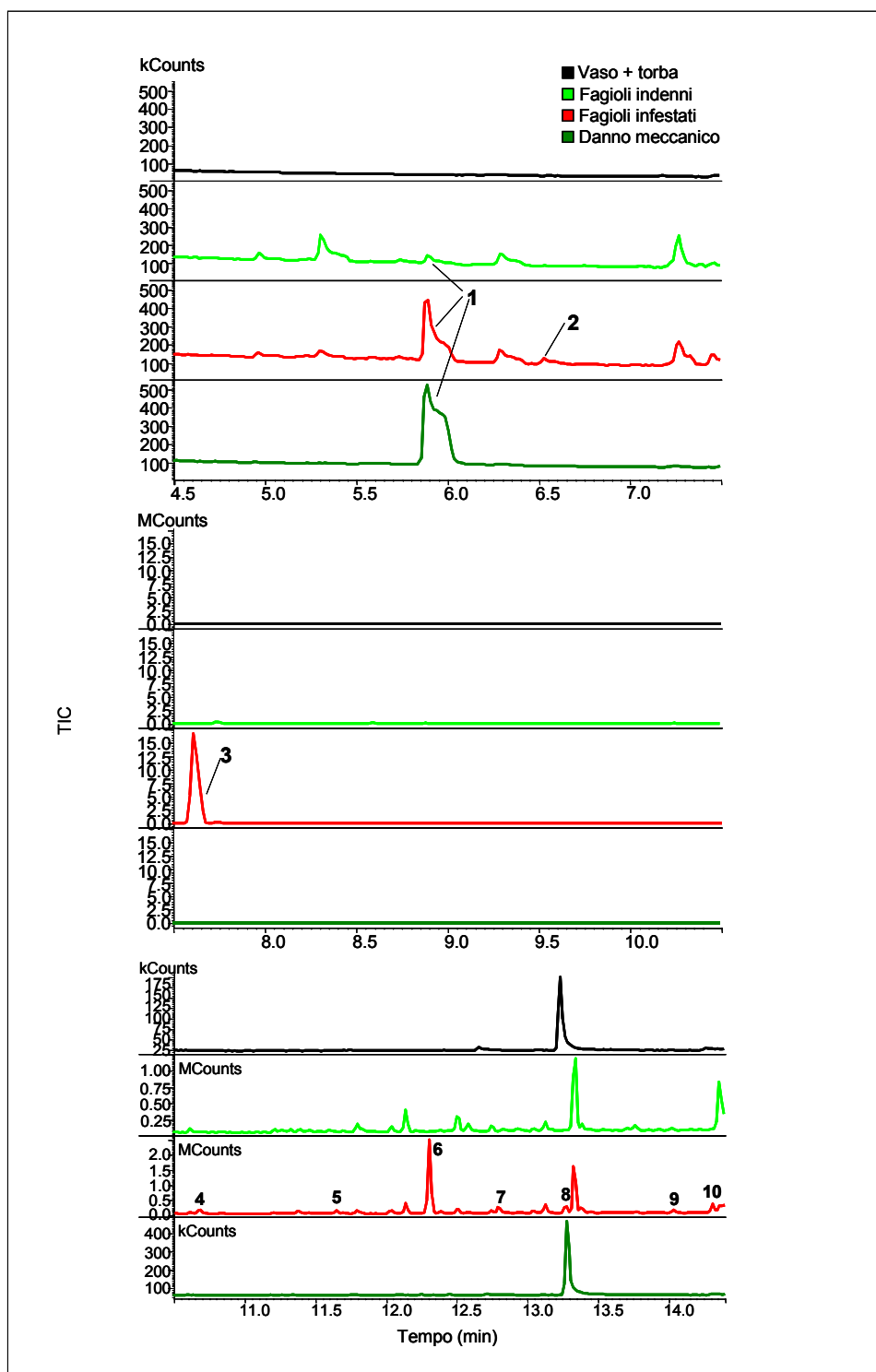


Figura 4.2. Profili gas-cromatografici dei composti volatili rilasciati dal testimone (vaso + torba), da piante di fagiolo indenni, da piante infestate da *L. trifolii* e da piante danneggiate meccanicamente. Sono riportate dall'alto in basso tre sezioni del cromatogramma: da 4,5 a 7,5 minuti, da 7,5 a 10,5 minuti, da 10,5 a 14,5 minuti. (1), acetato di 3-esenile; (2), o-cimene; (3), 4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene (DMNT); (4), indolo; (5), α -copaene; (6), β -cariofillene; (7), α -cariofillene; (8), α -farnesene; (9), nerolidolo; (10), esadecene.

4.2 Saggi biologici all'olfattometro

4.2.1 Saggi con gli estratti ottenuti mediante la tecnica dell'Air Entrainment

Gli estratti di piante di fagiolo indenni e piante infestate dal fillominatore, ottenuti mediante la tecnica dell'Air Entrainment, sono stati saggiati nell'olfattometro a Y per verificare la preferenza dell'insetto nei confronti dei due stimoli. Sul totale degli insetti saggiati nelle cinque replicazioni (tab. 4.3), la percentuale di parassitoidi che ha compiuto una scelta definitiva è stata del 58 %, di cui il 73% ha preferito l'estratto di pianta di fagiolo + *L. trifolii*. La differenza registrata sul totale delle scelte definitive, analizzata statisticamente, è risultata altamente significativa ($P = 0,009$; Test χ^2) (tab. 4.3 e fig. 4.3). Tale risultato dimostra la possibilità di estrarre, mediante la tecnica dell'Air Entrainment, i composti responsabili dell'attrattività osservata in precedenza nei confronti del materiale biologico (Bazzocchi e Maini, 2000).

Tabella 4.3 Analisi statistica dei risultati delle prove sperimentali condotte con gli estratti.

Replicazioni	Femmine di <i>D. isaea</i> saggiate (n)	Individui che hanno compiuto una scelta all'olfattometro (n)		χ^2 ^(b)	P	% di scelta
		Estratto piante indenni	Estratto piante infestate			
1	10	1	5			
2	10	2	6			
3	12	2	4			
4	10	2	3			
5	15	2	6			
Tot.	57	9	24	0,009	6,82	58

^(b) gradi di libertà = 1

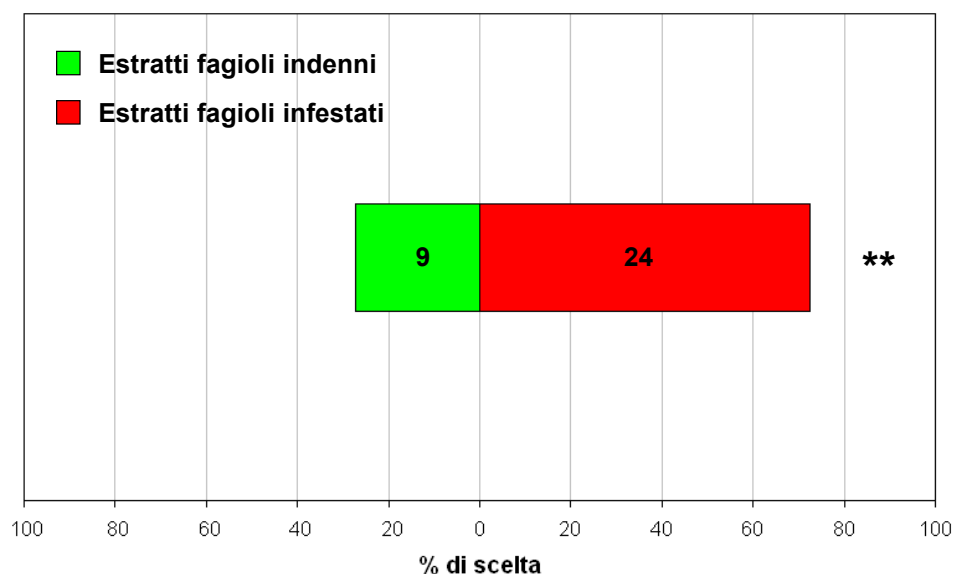


Figura 4.3 Risposte di femmine inesperte di *D. isaea* nei confronti di estratti di piante di fagiolo indenni e piante infestate da *L. trifolii*. Test χ^2 ; ** $P < 0,01$.

4.2.2 Saggi con le frazioni F_1 e F_2 ottenute mediante la tecnica della cromatografia liquido-solido (LC)

Le prove preliminari condotte con esano ed etere (tab. 4.4; prove sperimentali 1 e 3) hanno permesso di valutare gli effetti sul parassitoide dei solventi utilizzati nelle eluizioni. Su 50 femmine di *D. isaea* saggiate in ciascuna prova, la % di insetti che ha compiuto una scelta definitiva è stata del 62% nei saggi con solo esano e del 56% nelle prove con solo etere. Percentuali analoghe erano state riscontrate in precedenza nei saggi condotti con il materiale biologico (Bazzocchi e Maini, 2000). Questo risultato ci ha permesso pertanto escludere un eventuale effetto negativo dei solventi sulla performance degli insetti nell'olfattometro. La differenza registrata nelle scelte definitive compiute dagli insetti in entrambe le prove, analizzata statisticamente utilizzando il test χ^2 , non è mai risultata significativa ($P > 0,05$) (tab. 4.4; figg. 4.4 e 4.5).

Né la frazione F_1 dell'estratto attivo, contenente i composti apolari (idrocarburi saturi e insaturi), né la frazione F_2 , contenenti i composti polari (aldeidi e alcoli),

sono risultate più attrattive dei controlli (rispettivamente esano e etere); in entrambi i casi, la differenza registrata nelle scelte definitive tra le femmine del parassitoide che hanno preferito al solvente una delle due frazioni, analizzata statisticamente, non è risultata significativa (tab. 4.4; figg. 4.4 e 4.5).

Tabella 4.4 Analisi statistica dei risultati delle prove sperimentali condotte con le frazioni F₁ e F₂.

Prove sperimentali	Olfattometro a Y		Femmine <i>D. isaea</i> saggiate (n)	Scelte		χ^2 ^(b)	P	% di scelta
	Braccio 1	Braccio 2		Braccio 1 (n) ^(a)	Braccio 2 (n) ^(a)			
1	20 µl ESANO	20 µl ESANO	50	14	17	0,29	0,590	62
2	20 µl ESANO	20 µl F ₁	42	14	12	0,15	0,695	62
3	20 µl ETERE	20 µl ETERE	50	15	13	0,14	0,705	56
4	20 µl ETERE	20 µl F ₂	46	13	7	1,80	0,180	43

^(a) numero di femmine di *D. isaea* che ha effettuato una scelta

^(b) gradi di libertà = 1

F₁ = frazioni apolari dell'estratto

F₂ = frazioni polari dell'estratto

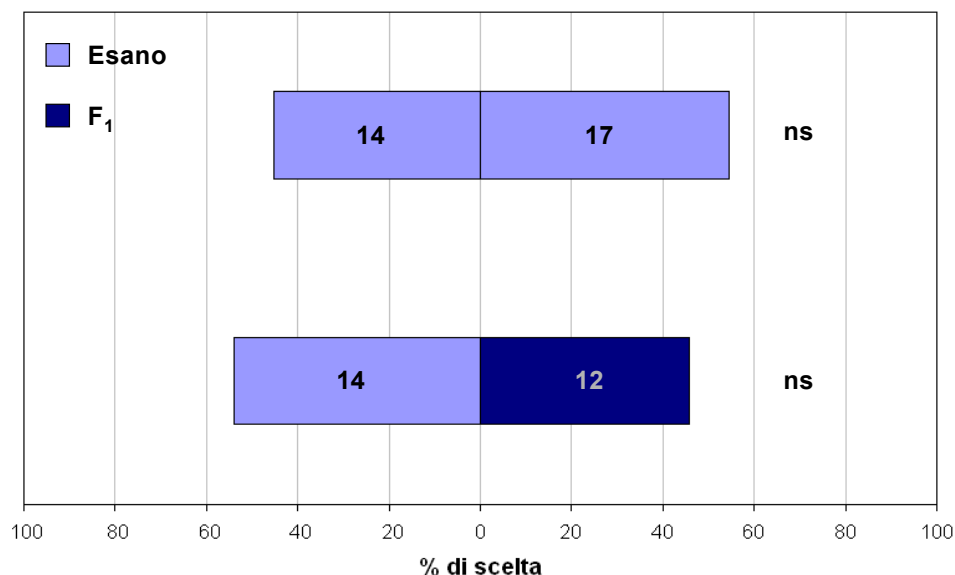


Figura 4.4 Risposte di femmine inesperte di *D. isaea* alle frazioni apolari F₁. Test χ^2 ; ns = differenza statisticamente non significativa.

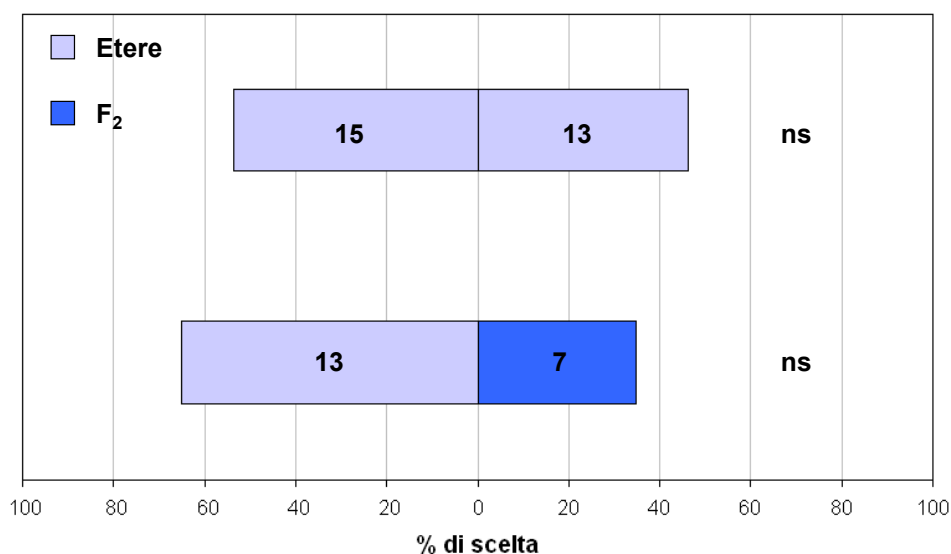


Figura 4.5 Risposte di femmine inesperte di *D. isaea* alle frazioni polari F₂. Test χ^2 ; ns = differenza statisticamente non significativa.

Dunque il tentativo di isolare, fra i molti composti presenti nell'estratto attivo, quelli dotati di attività biologica, si è rivelato infruttuoso. È possibile che l'assenza di attività biologica dimostrata dalle due frazioni possa dipendere dal fatto che, mediante il procedimento utilizzato, vengano separati composti che, per suscitare l'attrazione nel parassitoide, debbano essere presenti contemporaneamente in soluzione.

È altresì possibile che il procedimento di separazione cromatografica mediante gel di silice degradi uno o più composti attivi.

4.2.3 Saggi con i composti puri

I composti volatili emessi dalle piante di fagiolo a seguito del danno compiuto dalle larve di *L. trifolii* (indolo; α -copaene; β -cariofillene; α -cariofillene; α -farnesene) sono stati diluiti in etere e saggiati contro il solvente (etere) a tre concentrazioni (1 ng; 10 ng; 100 ng) su 50 femmine inesperte di *D. isaea*.

In tutte le prove sperimentali condotte con l'indolo, questo composto non è mai risultato attrattivo (fig. 4.6) e le differenze nelle scelte definitive compiute dai pa-

parassitoidi nelle tre prove non sono mai risultate statisticamente significative ($P > 0,05$; Test χ^2) (tab. 4.5). Con l'aumentare della concentrazione dell'indolo si assiste, al contrario, ad una sostanziale diminuzione sia della percentuale di scelta degli insetti, che dal 58 % nella prima prova (indolo: 1 ng) passa al 20 % nella terza prova (indolo: 100 ng), che della mobilità dei parassitoidi nell'olfattometro (gli insetti erano complessivamente poco mobili).

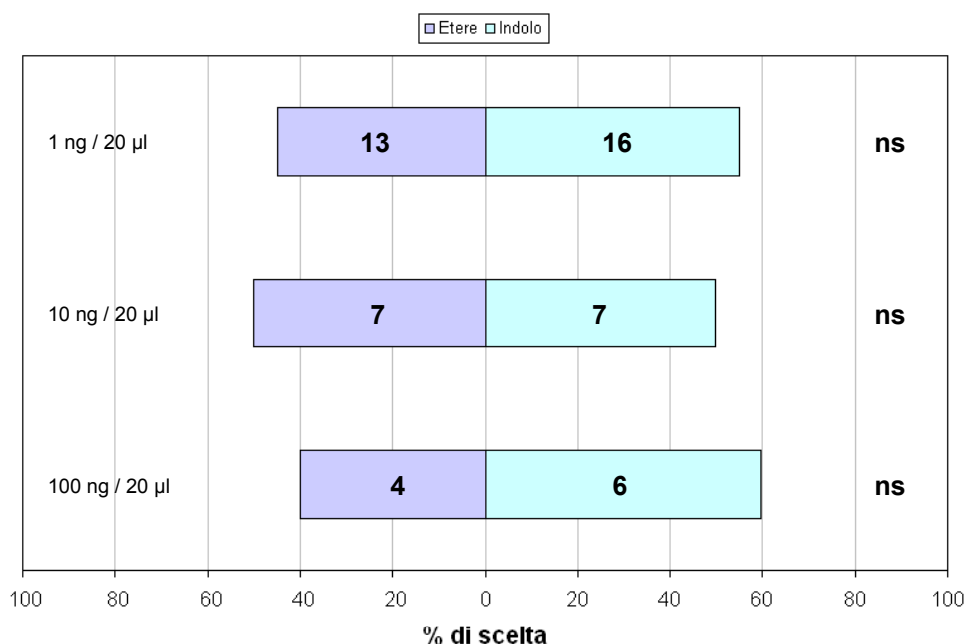


Figura 4.6 Risposte di femmine inesperte di *D. isaea* a diverse dosi di indolo (1 ng; 10 ng; 100 ng). Test χ^2 ; ns = differenza statisticamente non significativa.

Anche α -copaene e β -cariofillene complessivamente non sono risultati attrattivi (figg. 4.7 e 4.8), come dimostrano i risultati dell'analisi statistica compiuta sulle scelte definitive di tutte le prove sperimentali ($P > 0,05$; Test χ^2) (tab. 4.5). Ciononostante, a differenza dei saggi condotti in precedenza con l'indolo, l'aumento della concentrazione sia di α -copaene che di β -cariofillene determina proporzionalmente un aumento della percentuale di scelta degli insetti e, nel caso del β -cariofillene, anche della risposta dei parassitoidi nell'olfattometro (gli insetti erano estremamente reattivi).

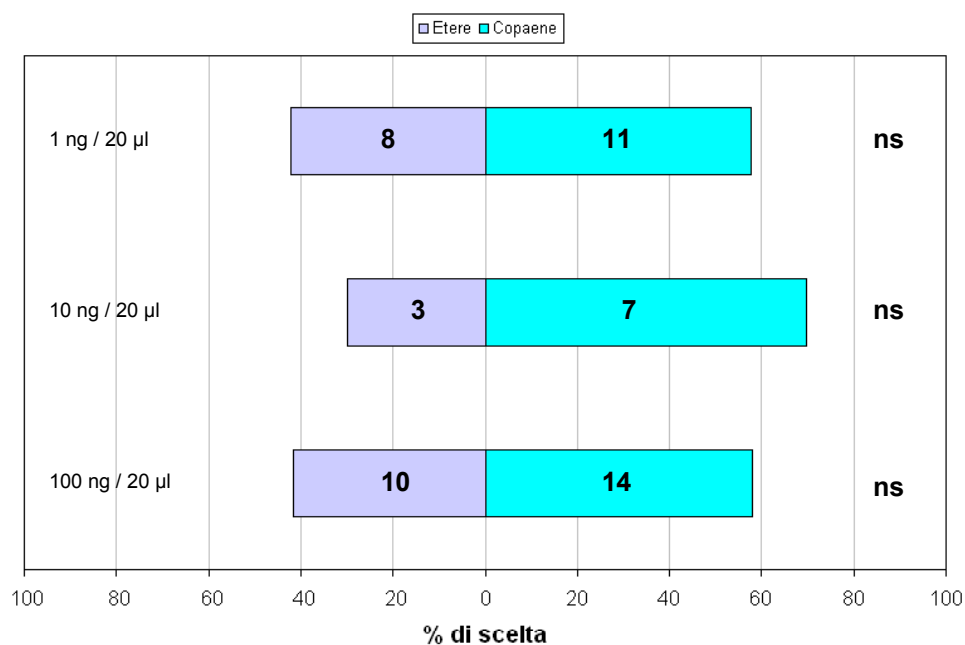


Figura 4.7 Risposte di femmine inesperte di *D. isaea* a diverse dosi di α -copaene (1 ng; 10 ng; 100 ng). Test χ^2 ; ns = differenza statisticamente non significativa.

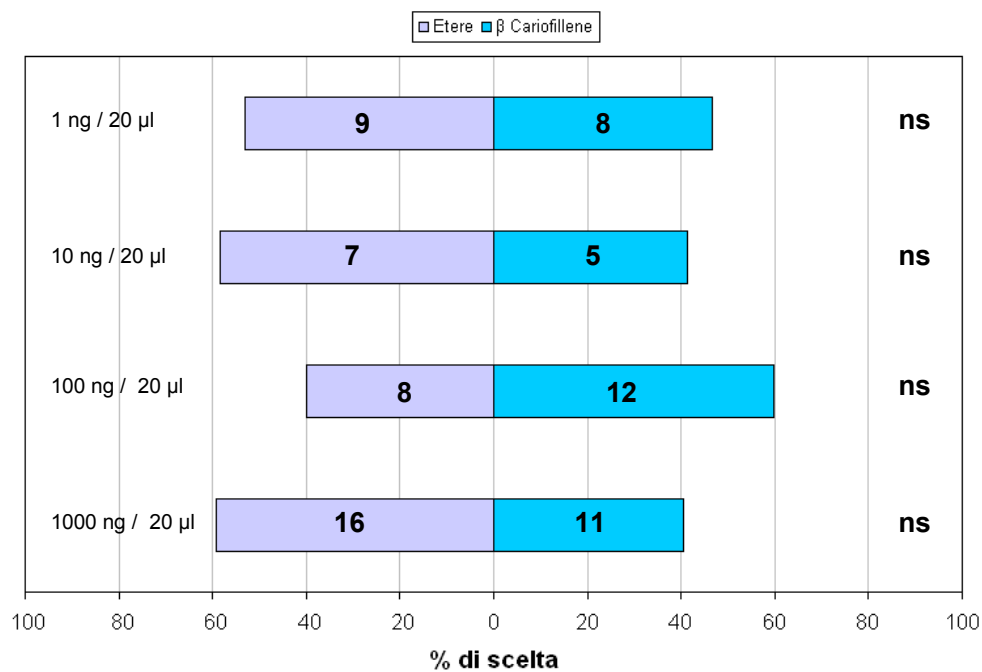


Figura 4.8 Risposte di femmine inesperte di *D. isaea* a diverse dosi di β -cariofillene (1 ng; 10 ng; 100 ng; 1000 ng). Test χ^2 ; ns = differenza statisticamente non significativa.

Tabella 4.5 Analisi statistica dei risultati delle prove sperimentali condotte con i composti puri.

Prove sperimentali	Olfattometro a Y		Femmine <i>D. isaea</i> saggiate (n)	Scelte		χ^2 ^(b)	P	% di scelta
	Braccio 1	Braccio 2		Braccio 1 (n) ^(a)	Braccio 2 (n) ^(a)			
1	20 µl ETERE	1 ng INDOLO / 20 µl ETERE	50	13	16	0,31	0,577	58
2	20 µl ETERE	10 ng INDOLO / 20 µl ETERE	50	7	7	0	1,000	28
3	20 µl ETERE	100 ng INDOLO / 20 µl ETERE	50	4	6	0,40	0,527	20
4	20 µl ETERE	1 ng α -COPAENE / 20 µl ETERE	50	8	11	0,47	0,491	38
5	20 µl ETERE	10 ng α -COPAENE / 20 µl ETERE	50	3	7	1,60	0,206	20
6	20 µl ETERE	100 ng α -COPAENE / 20 µl ETERE	50	10	14	0,67	0,414	48
7	20 µl ETERE	1 ng β -CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50	9	8	0,059	0,808	34
8	20 µl ETERE	10 ng β -CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50	7	5	0,33	0,564	24
9	20 µl ETERE	100 ng β -CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50	8	12	0,37	0,800	40
10	20 µl ETERE	1000 ng β -CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50	16	11	0,34	0,926	54
11	20 µl ETERE	1 ng α -CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50	5	11	2,25	0,134	32
12	20 µl ETERE	10 ng α -CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50	8	17	3,24	0,072	50
13	20 µl ETERE	100 ng α -CARIOFILLENE / 20 µl ETERE	50	10	21	3,90	0,048	62
14	20 µl ETERE	1 ng α -FARNESENE / 20 µl ETERE	50	11	14	0,36	0,549	50
15	20 µl ETERE	10 ng α -FARNESENE / 20 µl ETERE	50	4	5	0,11	0,739	18
16	20 µl ETERE	100 ng α -FARNESENE / 20 µl ETERE	50	17	6	5,26	0,022	46

^(a) numero di femmine di *D. isaea* che ha effettuato una scelta

^(b) gradi di libertà = 1

L'aumento della dose di α -cariofillene è accompagnato da un graduale aumento sia della percentuale di scelta degli insetti, che del numero di parassitoidi che preferiscono l' α -cariofillene al controllo (etere) (tab. 4.5); le differenze registrate nelle scelte definitive divengono statisticamente significative quando la concentrazione dell' α -cariofillene raggiunge i 100 ng ($P = 0,048$; Test χ^2) (tab. 4.5) (fig. 4.9). A tale concentrazione, la percentuale di parassitoidi che hanno compiuto una scelta definitiva è risultata in assoluto la più elevata (62%).

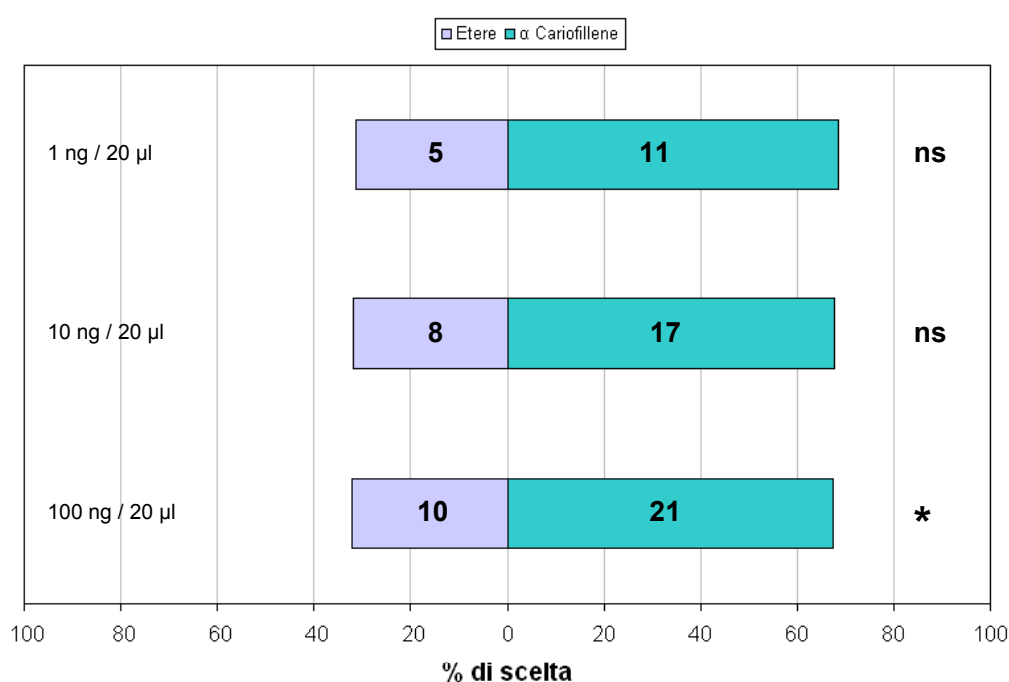


Figura 4.9 Risposte di femmine inesperte di *D. isaea* a diverse dosi di α -cariofillene (1 ng; 10 ng; 100 ng). Test χ^2 ; ns = differenza statisticamente non significativa; * $P < 0,05$.

Complessivamente l' α -farnesene non è mai risultato attrattivo. Sebbene la percentuale complessiva di scelta ottenuta nel saggio a 100 ng (46 %) non si discosti sensibilmente da quella ottenuta a 1 ng (50 %) (tab. 4.5), si registra nel corso delle prove, proporzionalmente all'aumento della concentrazione del composto, una sostanziale riduzione del numero di parassitoidi che scelgono l' α -farnesene, a favore di quelli che preferiscono il controllo (etere). Nei saggi a 100 ng la scelta a

favore del solvente (etere) ($P = 0,022$; Test χ^2) (fig. 4.10) induce a pensare che, a questa concentrazione, l' α -farnesene possa avere un effetto repellente sul comportamento dei parassitoidi.

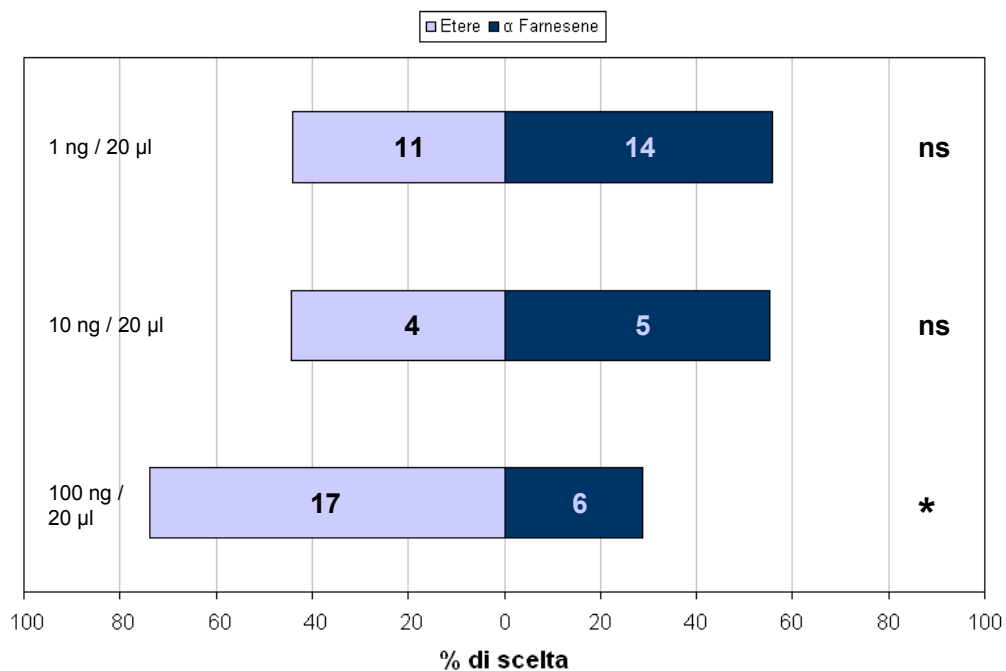


Figura 4.10 Risposte di femmine inesperte di *D. isaea* a diverse dosi di α -farnesene (1 ng; 10 ng; 100 ng). Test χ^2 ; ns = differenza statisticamente non significativa; * $P < 0,05$.

CAPITOLO 5

Discussione

5.1 Note metodologiche

Lo spazio di testa di un campione può essere trasferito all'iniettore del gas-cromatografo per mezzo di siringhe (*trasferimento diretto*) o per mezzo di fibre o polimeri porosi con elevate proprietà adsorbenti (*trasferimento indiretto*), da cui i composti adsorbiti sono rilasciati alla colonna del gas-cromatografo mediante eluizione con un solvente (deassorbimento mediante solvente) o trattamento rapido mediante calore (deassorbimento termico) (Agelopoulos e Pickett, 1998). Ogni metodologia presenta vantaggi e svantaggi e i risultati ottenuti sono condizionati dalle proprietà fisiche e chimiche dell'adsorbente, dalla concentrazione e dalle proprietà chimiche degli analiti e dalla loro distribuzione tra campione, spazio di testa e adsorbente (Núñez *et al.*, 1984).

L'obiettivo di questa ricerca era innanzitutto di mettere a punto una procedura che consentisse di estrarre *in vivo* dalle piante di fagiolo infestate da *L. trifolii* i composti volatili responsabili dell'attrazione del parassitoide *D. isaea* e permettesse di individuare i composti biologicamente attivi presenti nella miscela.

A tal fine sono state confrontate due metodologie di *trasferimento indiretto*, la tecnica statica dell'SPME e quella dinamica dell'Air Entrainment, impiegate in ecologia chimica per identificare e quantificare i composti organici volatili da numerose matrici biologiche. Mentre, per isolare i composti attivi, è stata impiegata la tecnica della cromatografia liquida su colonna.

L'SPME è un processo di estrazione che si basa sull'equilibrio tra il campione, i suoi vapori e la fibra. La concentrazione di un analita sulla fibra è condizionata:

(1), dalle sue proprietà chimiche, (2), dal tempo di equilibrio, che è il tempo necessario perchè la concentrazione di un composto presente nello spazio di testa del campione sia direttamente proporzionale alla sua concentrazione sulla fibra (il tempo di equilibrio dipende dalla natura del composto, ovvero dal suo peso molecolare) e (3), dalle condizioni sperimentali, che possono modificarne il tasso di assorbimento.

I profili gas-cromatografici dei campioni, analizzati mediante l'SPME, sono risultati profondamente differenti da quelli ottenuti mediante l'impiego dei polimeri porosi (tecnica dell'Air Entrainment), sia a livello qualitativo che quantitativo (tabb. 4.1 e 4.2; figg. 4.1 e 4.2). Le cause di queste differenze non sono state individuate. Si può ipotizzare che il tempo di esposizione della fibra allo spazio di testa del campione (45 minuti) non sia stato sufficiente per consentire a tutti gli analiti di raggiungere l'equilibrio con la fibra, dato che composti differenti sono caratterizzati da differenti tempi di equilibrio, oppure che la causa risieda nelle condizioni sperimentali. L'SPME infatti, a differenza di altre tecniche analoghe, risente notevolmente di parametri come umidità, temperatura e tempo di campionamento, tutte condizioni che dovrebbero essere stabilite sulla base delle caratteristiche del campione e non dettate dalla metodologia utilizzata (Agelopoulos e Pickett, 1998).

A differenza dell'SPME, in cui la piccola quantità di adsorbente che riveste la fibra condiziona notevolmente la durata del campionamento, con la tecnica dinamica dell'Air Entrainment il processo di estrazione si può estendere per un periodo di tempo che può essere anche molto lungo (in questo studio 15 ore). Inoltre, attraverso questa metodologia si ottengono dei campioni liquidi (miscele) che possono essere conservati in freezer ($T = -20^{\circ}\text{C}$) e saggiati sugli organismi oggetto di studio.

Alla luce dei risultati ottenuti, si può affermare che la tecnica dell'Air Entrainment si è rivelata più adatta al raggiungimento degli obiettivi di questo studio. Grazie a questa metodologia infatti è stato possibile verificare l'attività biologica

delle miscele estratte nei confronti di *D. isaea* e identificare i composti volatili imputabili, con buona probabilità, unicamente all'attività trofica del suo ospite (*L. trifolii*) (tab. 4.2).

5.2 Composti chimici rilasciati da piante di fagiolo infestate

Da questo studio è emerso che piante di fagiolo infestate da *L. trifolii* emettono principalmente terpenoidi volatili come l'ocimene, il β -cariofillene e il 4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene). Tali sostanze sono state spesso indicate come importanti segnali utilizzati da predatori e parassitoidi per localizzare le proprie prede o i propri ospiti (Paré e Tumlinson, 1999).

Analizzando al gas-cromatografo le miscele ottenute da piante di fagiolo indenni, piante danneggiate meccanicamente e piante infestate da larve di *L. trifolii* e confrontando tra loro i cromatogrammi è emersa una profonda differenza nei profili dei campioni, sia a livello qualitativo che quantitativo. Questo risultato non è in accordo con quanto riportato da Finidori-Logli *et al.* (1996), che hanno cercato di identificare i composti emessi dal complesso *P. vulgaris* – *L. trifolii* impiegando il metodo di intrappolamento a freddo, una tecnica che consente di estrarre i composti volatili in condizioni naturali, evitando di campionare tutte quelle molecole scarsamente volatili rilasciate dalle piante a seguito di processi di macerazione o di tritramento (Wolfender *et al.*, 1993). Stando ai risultati pubblicati da Finidori-Logli *et al.* (1996), i profili dei campioni differirebbero solo quantitativamente, con l'eccezione del 1-octen-3-olo, che sembrerebbe essere rilasciato solo dalle piante minate. Lo stato della pianta parrebbe influire su queste differenze quantitative, come dimostra il fatto che alcuni composti (*cis*-3-esenolo; 4-idrossi-4-metil-2-pentanone), emessi solo in tracce dalle piante indenni, sono rilasciati abbondantemente sia dalle piante minate che da quelle danneggiate meccanicamente. In generale si ritiene che la discrepanza fra i risultati ottenuti in questo

studio e quelli riportati da Finidori-Logli *et al.* (1996) possa dipendere dalla differente tecnica di estrazione impiegata (Agelopoulos e Pickett, 1998).

I risultati dei saggi all'olfattometro ottenuti da Finidori-Logli *et al.* (1996) con gli estratti sono in accordo con i risultati delle prove sperimentali eseguite nel corso di questo studio e permettono di ipotizzare che il parassitoide *D. isaea* riesca a riconoscere le piante di fagiolo infestate da quelle indenni, basandosi sugli odori che esse rilasciano nell'ambiente circostante, dimostrando nel contempo che è possibile estrarre questi composti con l'impiego di tecniche opportune. È importante però precisare che si tratta di risultati ottenuti in laboratorio dove, a differenza delle condizioni che si possono riscontrare in campo, gli stimoli olfattivi sono estremamente semplificati.

Recentemente Wei *et al.* (2006) hanno analizzato lo spazio di testa di piante di fagiolo infestate da larve di *L. sativae* e da larve di *L. huidobrensis* e hanno confrontato i composti volatili emessi da questi campioni con quelli rilasciati da piante indenni e danneggiate artificialmente. L'obiettivo era verificare se possano esistere differenze nelle emissioni di volatili tra piante di fagiolo danneggiate da specie imparentate filogeneticamente, ovvero se differenti abitudini alimentari, come quelle delle due specie in esame, possano in qualche modo ripercuotersi sulle miscele volatili emesse dalle piante. L'analisi delle miscele ha permesso di stabilire che non esistono differenze qualitative ma solo quantitative tra i profili dei composti volatili emessi dalle piante attaccate dai due agromizidi. Le piante di fagiolo infestate da larve di *L. huidobrensis* rilasciano quantitativi superiori di composti volatili rispetto a quelle infestate da *L. sativae* e questa differenza potrebbe essere correlata alle differenti abitudini alimentari delle due specie. Le punture di nutrizione e ovideposizione di *L. huidobrensis* risultano più ampie e le mine, scavate dalle larve, si sviluppano a spese sia del tessuto a palizzata che di quello lacunoso, mentre le larve di *L. sativae*, come quelle di *L. trifolii*, si nutrono solo del tessuto a palizzata (Parrella e Bethke, 1984).

I risultati raggiunti da Wei *et al.* (2006) sono in accordo con quelli ottenuti in questo studio. Numerosi composti individuati da questi autori nelle miscele estratte da piante di fagiolo danneggiate da *L. huidobrensis* e *L. sativae*, sono stati individuati anche in questo studio negli estratti di piante infestate da *L. trifolii* (acetato di 3-esenile; ocimene; 4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene; β -cariofillene; α -cariofillene; α -farnesene).

Una volta stabilito quali composti vengano rilasciati dalle piante di fagiolo a seguito del danno compiuto dai due fillominatori (*L. huidobrensis* e *L. sativae*), gli stessi autori (Wei e Kang, 2006) hanno cercato di chiarire il ruolo biologico dei composti volatili identificati, analizzando il loro effetto sul comportamento del parassitoide *O. dissitus* (Hymenoptera Braconidae), capace di parassitizzare le larve di entrambi gli agromizidi. Saggiati all'olfattometro rispetto al solvente (esano), gli estratti di piante di fagiolo danneggiate dai due fitofagi sono risultati estremamente attrattivi, a differenza delle miscele ottenute dalle piante indenni. Accoppiando alla gas-cromatografia la tecnica elettrofisiologica, Wei e Kang (2006) hanno analizzato le risposte antennali di *O. dissitus* verso gli estratti risultati attivi nei saggi biologici, arrivando ad identificare i composti potenzialmente attivi, che sono stati saggiati singolarmente all'olfattometro a Y contro il solvente (esano). Tra i composti isolati, linalolo e α -farnesene hanno confermato la loro attrattività anche nei saggi biologici, mentre l'acetato di 3-esenile, il 4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene, e il β -cariofillene, che erano risultati attivi all'elettroantennogramma, si sono rivelati scarsamente attrattivi nei saggi.

L'analisi statistica delle differenze registrate nelle scelte definitive compiute da *D. isaea*, nel corso delle prove condotte con i composti puri (indolo; α -copaene; β -cariofillene; α -cariofillene; α -farnesene), ha messo in luce come questo parassitoide risulti attratto solo dall' α -cariofillene (100 ng), mentre l' α -farnesene (100 ng) sembra avere nei confronti dell'eulofide un effetto repellente.

Premesso che non è stato possibile saggiare tutti i composti volatili identificati (tab. 4.2) e che occorrerà in futuro cercare di sintetizzare e saggiare quelli at-

tualmente non disponibili in commercio (in particolare ocimene e 4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene), appare chiaro, analizzando i risultati dei saggi biologici, come i due imenotteri, *O. dissitus* e *D. isaea*, risultino attratti da composti differenti, pur avendo gli stessi ospiti.

Si possono interpretare i risultati ottenuti con *D. isaea* integrando le analisi compiute in questo studio con quelle ottenute da Wei e Kang (2006). Stando ai risultati pubblicati da questi autori, l' α -cariofillene sarebbe emesso solo dalle piante infestate da larve di seconda e terza età di *L. sativae* e *L. huidobrensis*. Poichè *D. isaea* parassitizza preferibilmente larve di quelle età e può attaccare indistintamente i tre fillominatori, questo potrebbe spiegare l'attrattività dell' α -cariofillene nei confronti del parassitoide.

Essendo *D. isaea* un ectoparassitoide polifago, deve essere in grado di riconoscere gli stimoli olfattivi di tutti i suoi potenziali ospiti. Poichè spesso si tratta di specie lontane sistematicamente e che si nutrono di differenti specie vegetali, è plausibile che questo parassitoide si affidi ad un segnale chimico differente da quello utilizzato da *O. dissitus* che, in quanto endoparassitoide, risulta essere più legato ai propri ospiti.

Guerin *et al.* (1983) ipotizzano che la localizzazione dell'ospite da parte dei parassitoidi, piuttosto che l'effetto di un composto singolo, sia il risultato della sinergia tra composti comuni a numerose specie vegetali con altre molecole più specifiche. Questa ipotesi potrebbe spiegare la capacità di *D. isaea* di parassitizzare specie fillominatrici differenti (Finidori-Logli *et al.*, 1996). È possibile che alcune molecole agiscano “a lungo raggio”, facilitando la localizzazione dell'habitat, mentre altre, provenienti dalle piante infestate, dalle feci dell'ospite o da altre sue secrezioni, svolgano un'azione a “a breve raggio”, fornendo informazioni più specifiche circa l'ospite e i siti dove possono essere rinvenuti. L' α -cariofillene potrebbe, per *D. isaea*, essere parte di questo bouquet di segnali a breve raggio.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- AGELOPOULOS N.G., PICKETT J.A., 1998. Headspace analysis in chemical ecology: effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples. *J. Chem. Ecol.*, 24(7): 1161-1172.
- ALPHEN J.J.M. VAN, JERVIS M.A., 1996. Foraging behaviour. In: Jervis e Kidd (eds.) "Insect natural enemies" Chapman & Hall: 1-63.
- ALBORN H.T., TURLINGS T.C.J., JONES T.H., STENHAGEN G., LOUGHRIN J.H., TUMLINSON J.H., 1997. An elicitor of plant volatiles from Beet armyworm oral secretion. *Science*, 276: 945-949.
- ALBORN H.T., JONES T.H., STENHAGEN G., TURLINGS T.C.J., TUMLINSON J.H., 2000. Identification and synthesis of volicitin and related components from beet armyworm oral secretions. *J. Chem. Ecol.*, 26(1): 203-220.
- ARZONE A., 1979. L'Agromizide neartico *Liriomyza trifolii* (Burgess) nuovo nemico di *Gerbera* in Italia. *Inf. Fitopat.*, 3: 3-6.
- BAZZOCCHI G.G., MAINI S., 2000. Ruolo dei semiochimici volatili nella ricerca dell'ospite da parte del parassitoide *Diglyphus isaea* (Hymenoptera Eulophidae). Prove olfattometriche. *Boll. Ist. Ent. "G. Grandi" Univ. Bologna*, 54: 143-154.
- BAZZOCCHI G.G., FABBRI E., MAINI S., 2005. Risposte comportamentali di *Liriomyza trifolii* e *Diglyphus isaea* a semiochimici emessi da piante di fagiolo danneggiate dal fillominatore. *Proceedings XX Congresso Nazionale Italiano di Entomologia. Perugia – Assisi 13 – 18 Giugno 2005*: 148.

- BENUZZI M., NICOLI G., 1988. Lotta biologica e integrata in colture protette (strategie e tecniche possibili). Centrale Ortofrutticola alla Produzione, Cesena (FO): 168 pp.
- BENUZZI M., RABONI F., 1992. *Diglyphus isaea*. *Inf. Fitopat.*, 11: 29-34.
- BERNASCONI M.L., TURLINGS T.C.J., AMBROSETTI L., BASSETTI P., DORN S., 1998. Herbivore-induced emissions of maize volatiles repel the corn leaf aphid, *Rhopalosiphum maidis*. *Entomol. Exp. Appl.*, 87(2): 133-142.
- BERTSCHY C., TURLINGS T.C.J., BELLOTTI A.C., DORN S., 1997. Chemically-mediated attraction of three parasitoid species to mealybug-infested cassava leaves. *Fla. Entomol.*, 80(3): 383-395.
- BIRCH M.C., HAYNES K.F., 1984. Introduzione ai feromoni. Clesav, Milano: 95 pp.
- BOUCEK Z., ASKEW R.R., 1968. Index of palearctic Eulophidae (excl. Tetrastichinae). Le François, Paris: 254 pp.
- BOLTER C.J., DICKE M., VAN LOON J.J.A., VISSER J.H., POSTHUMUS M.A., 1997. Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *J. Chem. Ecol.*, 23:(4) 1003-1023.
- BOUWMEESTER H.J., VERSTAPPEN F., POSTHUMUS M.A., DICKE M., 1999. Spider-mite induced (3S)-(E)-nerolidol synthase in cucumber and Lima bean. The first dedicated step in acyclic C₁₁-homoterpene biosynthesis. *Plant Physiol.*, 121(1): 173–180.
- CALABRETTA C., FIRULLO V., 1983. Lotta integrata e sue prospettive di successo contro *Liriomyza trifolii* (Burg.) in colture protette del Ragusano. *Proceedings XIII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia. Sestriere-Torino*: 197-204.
- CELLI G., MAINI S., 1988. Lotta biologica integrata in agricoltura. Cestaat, Roma: 196 pp.

- CHARLTON C.A., ALLEN W.W., 1981. The biology of *Liriomyza trifolii* on beans and chrysanthemums. In: Schuster D.J., (ed). -Proc. IFAS-Ind. Conf. Biol. Control *Liriomyza* leafminers. Univ. Fla., IFAS: 42-49.
- COLAZZA S., FUCARINO A., PERI E., SALERNO G., CONTI E., BIN F., 2004. Insect oviposition induces volatile emission in herbaceous plants that attracts egg parasitoids. *J. Exp. Biol.*, 207(1): 47-53.
- COSTA A.S., DE SILVA D.M., DUFFUS J.E., 1958. Plant virus transmission by a leaf-miner fly. *Virology*, 5(1): 145-149.
- DEL BENE G., 1984. Osservazioni sul ciclo biologico di *Liriomyza trifolii* (Burg.) (Dipt. Agromyzidae) su gerbera e sui suoi nemici naturali in Toscana. *REDIA*, 67: 435-448.
- DEL BENE G., 1989. Nemici naturali di *Liriomyza trifolii* (Burgess), *Chromatomyia horticola* (Goureau) e *Chromatomyia syngenesiae* Hardy (Dipt. Agromyzidae) in Toscana. *REDIA*, 72(2): 529-544.
- DEL PICCOLO F., NAZZI F., FABBRI E., MAINI S., 2007. Indagini sul feromone sessuale del dittero agromizide *Liriomyza trifolii* (Burgess). *Proceedings XXI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia. Campobasso 11 – 16 Giugno 2007*: 188.
- DE MORAES C.M., LEWIS W.J., PARÉ P.W., ALBORN H.T., TUMLINSON J.H., 1998. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature*, 393: 570-573.
- DE MORAES C.M., MESCHER M.C., TUMLINSON J.H., 2001. Caterpillar-induced nocturnal plant volatiles repel conspecific females. *Nature*, 410: 577-580.
- DICKE M., VAN BEEK T.A., POSTHUMUS M.A., BEN DOM N., VAN BOKHOVEN H., DE GROOT A.E., 1990. Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predator-prey interactions. Involvement of host plant in its production. *J. Chem. Ecol.*, 16(2): 381-396.

- DU Y.J., POPPY G.M., POWELL W., 1996. Relative importance of semiochemicals from the first and second trophic levels in host foraging behaviour of *Aphidius ervi*. *J. Chem. Ecol.*, 22(9): 1591-1605.
- DU Y.J., POPPY G.M., POWELL W., WADHAMS L.J., 1997. Chemically mediated associative learning in the host foraging behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Insect Behav.*, 10(4): 509-522.
- FINIDORI-LOGLI V., BAGNÈRES A.G., CLEMÈNT J.L., 1996. Role of plant volatiles in the search for a host by parasitoid *Diglyphus isaea* (Hymenoptera Eulophidae). *J. Chem. Ecol.*, 22(3): 541-558.
- FLEMING W.E., 1972. Biology of the Japanese Beetle. U.S.D.A. Tech. Bull. 1149. Washington D.C., 129 pp.
- GUERIN P.M., STAEDLER M., BUSER H.R., 1983. Identification of host plant attractants for the carrot fly, *Psila rosae*. *J. Chem. Ecol.*, 9(7): 843-861.
- GUERRIERI E., PENNACCHIO F., TREMBLAY E., 1993. Flight behavior of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) in response to plant and host volatiles. *Eur. J. Entomol.*, 90(9): 415-421.
- GUERRIERI E., DU Y.J., POPPY G.M., POWELL W., PENNACCHIO F., TREMBLAY E., 1996. The role of host-induced plant synomones on in-flight orientation of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera, Braconidae). *Proceedings XX Congresso Internazionale di Entomologia. Firenze, Agosto 1996*: 647.
- GUERRIERI E., PENNACCHIO F., TREMBLAY E., 1997. Effect of adult experience on in-flight orientation to plant and plant-host complex volatiles in *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae). *Biol. Control*, 10(3): 159-165.
- HAGEN K.S., DADD R.H., REESE J., 1984. The food of insects. In: Huffaker C.B., Rabb R.L., (Eds.). -Ecological entomology.- New York, John Wiley and Sons: 79-112.

- HENDRY L.B., GREANY P.D., GILL R.J., 1973. Kairomone mediated host-finding behavior in parasitic Wasp *Orgilus lepidus*. *Ent. Exp. Appl.*, 16(4): 471-477.
- HERN A., DORN S., 1999. Sexual dimorphism in the olfactory orientation of adult *Cydia pomonella* in response to α -farnesene. *Entomol. Exp. Appl.* 92(1): 63-72.
- JEANNE R.L., 1970. Chemical defense of brood by a social Wasp. *Science*, 168: 1465-1466.
- LANZONI A., BAZZOCCHI G.G., BURGIO G., FIACCONI M.R., 2002. Comparative life history of *Liriomyza trifolii* and *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) on beans: effect of temperature on development. *Environ. Entomol.*, 31(5): 797-803.
- LEIBEE G.L., 1984. Influence of temperature on development and fecundity of *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae) on celery. *Environ. Entomol.*, 13(2): 497-501.
- LOUGHRIN J.H., MANUKIAN A., HEATH R.R., TURLINGS T.C., TUMLINSON J.H., 1994. Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91(25): 11836-11840.
- LOUGHRIN J.H., POTTER D.A., HAMILTON-KEMP T.R., 1995. Volatile compounds induced by herbivory act as aggregation kairomones for the Japanese beetle (*Popilia japonica* Newman). *J. Chem. Ecol.*, 21(10): 1457-1467.
- MALOSSE C., RAMIREZ-LUCAS P., ROCHAT D., MORIN J., 1995. Solid-phase microextraction, an alternative method for the study of airborne insect pheromones (*Metamasius hemipterus*, Coleoptera, Curculionidae). *J. High. Resolut. Chromatogr.*, 18(10): 669-670.
- MASUTTI L., ZANGHERI S., 2001. Entomologia generale e applicata. Cedam Ed., Padova: 978 pp.

- MATTIACCI L., DICKE M., POSTHUMUS M.A., 1995. β -Glucosidase: an elicitor of herbivore-induced plant odor that attracts host-searching parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92: 2036-2040.
- McCALL P.J., TURLINGS T.C.J., LEWIS W.J., TUMLINSON J.H., 1993. Role of plant volatiles in host location by the specialist parasitoid *Microplitis croceipes* cresson (Braconidae: Hymenoptera). *J. Insect Behav.*, 6(5): 625-639.
- MILLER G.W., ISGER M.B., 1985. Effects of temperature on the development of *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae). *Bull. Ent. Res.*, 75(2): 321-328.
- MINKENBERG O.P.J.M., 1990. On seasonal inoculative biological control. Ph.D. Thesis, Wageningen University (NL): 230pp.
- MINKENBERG O.P.J.M., VAN LENTEREN J.C., 1986. The leafminers *Liriomyza bryoniae* and *Liriomyza trifolii* (Dipt.: Agromyzidae), their parasites and host plants: a review. *Agricultural University Wageningen Papers*, 86-2: 50 pp.
- NGI-SONG A.J., OVERHOLT W.A., NJAGI P.G.N., DICKE M., AYERTEY J.N., LWANDE W., 1996. Volatile infochemicals used in host and host habitat location by *Cotesia flavipes* Cameron and *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of stemborers on Graminae. *J. Chem. Ecol.* 22(2): 307-323.
- NICOLI G., PITRELLI P., 1993. Parasitization and predation of *Diglyphus isaea*. In: Nicoli G., Benuzzi M., Leppla N.C., (Eds.). *Proceedings of the 7th workshop of the global IOBC working group "quality control of mass reared arthropods"*. Rimini (I), 13-16 September 1993: 161-170.
- NICOLI G., CORNALE R., CORAZZA L., BENUZZI M., PASQUALINI E., CELLI G., 1985. Lotta biologica in serra: realtà e prospettive. *Atti del Seminario Centrale Ortofrutticola di Cesena del 27/3/1985*. Ed. Regione Emilia-Romagna: 95-113.

- NÚÑEZ A.J., GONZÁLEZ L.F., JANÁK J., 1984. Pre-concentration of headspace volatiles from trace organic analysis by gas chromatography. *J. Chromatogr.* 300: 127-162.
- OLIVERA C., BORDAT D., LETOURMY P., 1993. Influence de la temperature sur le comportement de ponte des femelles de *Liriomyza trifolii* (Burgess) et de *Liriomyza huidobrensis* (Blanchard), mineuses serpentines americaines (Diptera: Agromyzidae). In: "*Liriomyza*"- Colloque sur les mouches mineuses des plantes cultivées.- Montpellier (F), 24-26 Mars 1993: 37-48.
- PARDI L., TURILLAZZI S., 1985. Biologia delle Stenogastrinae. *Atti Accad. Naz. Ital. Entom., Rend.* 30-32: 25-43.
- PARÉ P.W., TUMLINSON J.H., 1997a. De novo biosynthesis of volatiles induced by insect herbivory in cotton plants. *Plant Physiol.*, 114: 1161-1167.
- PARÉ P.W., TUMLINSON J.H., 1997b. Induced synthesis of plant volatiles. *Nature*, 385: 30-31.
- PARÉ P.W., TUMLINSON J.H., 1998. Cotton volatiles synthesized and released distal to the site of insect damage. *Phytochemistry*, 47(4): 521-526.
- PARÉ P.W., TUMLINSON J.H., 1999. Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiol.*, 121: 325-331.
- PARÉ P.W., ALBORN H.T., TUMLINSON J.H., 1998. Concerted biosynthesis of an insect elicitor of plant volatiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(23): 13971-13975.
- PARRELLA M.P., 1983. Intraspecific competition among larvae of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae): effects on colony production. *Environ. Entomol.*, 12(5): 1412-1414.
- PARRELLA M.P., 1984. Effect of temperature on oviposition feeding, and longevity of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). *Can. Entomol.*, 116: 85-92.

- PARRELLA M.P., 1987. Biology of *Liriomyza*. *Annu. Rev. Entomol.*, 32: 201-224.
- PARRELLA M.P., BETHKE J.A., 1984. Biological studies of *Liriomyza huidobrensis* (Diptera: Agromyzidae) on chrysanthemum, aster and pea. *J. Econ. Entomol.*, 77(2): 342-345.
- PARRELLA M.P., JONES V.P., YOUNGMAN R.R., LEBECK L.M., 1985. Effects of leaf mining and leaf stippling of *Liriomyza* spp. on photosynthetic rates of chrysanthemum. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 78(1): 90-93.
- PETITT F.L., TURLINGS T.C.J., WOLF S.P., 1992. Adult experience modifies attraction of the leafminer parasitoid *Opius dissitus* (Hymenoptera: Braconidae) to volatile semiochemicals. *J. Insect Behav.*, 5(5): 623-634.
- POTTING R.P.J., VET L.E.M., DICKE M., 1995. Host microhabitat location by stemborer parasitoid *Cotesia flavipes*: the role of herbivore volatiles and locally and systemically induced plant volatiles. *J. Chem. Ecol.*, 21(5): 525-539.
- POWELL W., PENNACCHIO F., POPPY G.M., TREMBLAY E., 1998. Strategies involved in the location of hosts by the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Biol. Control*, 11(2): 104-112.
- QUAGLIA F., 1980. -Ricerche sull'impiego di mezzi di lotta alternativi contro gli insetti dannosi alle colture protette. II. Primi risultati ottenuti in serre della Toscana e del Lazio utilizzando trappole cromotropiche per il controllo del *Trialeurodes vaporariorum* (Westw.) e dei Ditteri Agromizidi *Phytomyza horticola* Gour. e *Liriomyza trifolii* (Burg.). *Atti XII Congr. Naz. Ital. Ent., Roma, 1980 (II)*: 325-326.
- QUIROZ A., PETTERSSON J., PICKETT J.A., WADHAMS L.J., NIEMEYER H.M., 1997. Semiochemicals mediating spacing behavior of bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*, feeding on cereals. *J. Chem. Ecol.*, 23(11): 2599-2607.

- REGNIER F.E., WILSON E.O., 1971. Chemical communication and «propaganda» in slave-maker ants. *Science*, 172: 267-269.
- RÖSE U.S., MANUKIAN A., HEATH R.R., TUMLINSON J.H., 1996. Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves: a systemic response of living plants to caterpillar damage. *Plant Physiol.*, 111(2): 487-495.
- SABELIS M.W., VAN DE BAAN H.E., 1983. Location of distant spider-mite colonies by phytoseiid predators. Demonstration of specific kairomones emitted by *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychus, Phytoseiidae). *Entomol. Exp. Appl.*, 33: 303-314.
- SATO Y., YANO S., TAKABAYASHI J., OHSAKI N., 1999. *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) females avoid oviposition on *Rorippa indica* plants infested by conspecific larvae. *Appl. Entomol. Zool.*, 34(3): 333-337.
- SHIOJIRI K., TAKABAYASHI J., 2003. Effects of specialist parasitoids on oviposition preference of phytophagous insects: encounter-dilution effects in a tritrophic interaction. *Ecol. Entomol.*, 28(5): 573-578.
- SPENCER K.A., 1973. Agromyzidae (Diptera) of economic importance. In: Junk W. (ed.). Series Entomologica 9. The Hague: 418 pp.
- STANLEY-SAMUELSON D.W., 1994. Prostaglandins and related eicosanoids in insects. *Adv. Insect Physiol.*, 24: 115-212.
- STEFFEN A., PAWLISZYN J., 1996. Analysis of flavor volatiles using headspace solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, 44(8): 2187-2193.
- STEINBERG S., DICKE M., VET L.E.M., WANNINGEN R., 1992. Response of the braconid parasitoid *Cotesiae* (= *Apanteles*) *glomerata* to volatile infochemicals: effects of bioassay set-up parasitoid age and experience and barometric flux. *Entomol. Exp. Appl.*, 63(2): 163-175.
- STEINBERG S., DICKE M., VET L.E.M., 1993. Relative importance of infochemicals from first and second trophic level in long-range host

- location by the larval parasitoid *Cotesia glomerata*. *J. Chem. Ecol.*, 19(1): 47-59.
- SÜSS L., 1985. Comportamento biologico di *Liriomyza trifolii* (Burg.) (Dipt.: Agromyzidae) in serra e in pieno campo. *Notiziario malattie delle piante*, 106: 73-80.
- TAKABAYASHI J., DICKE M., 1996. Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends Plant Sci.*, 1(4): 109-113.
- TAKABAYASHI J., DICKE M., POSTHUMUS M.A., 1991. Variation in composition of predator-attracting allelochemicals emitted by herbivore-infested plants: relative influence of plant and herbivore. *Chemoecology*, 2(1): 1-6.
- TAKABAYASHI J., DICKE M., POSTHUMUS M.A., 1994. Volatile herbivore-induced terpenoids in plant-mite interactions: variation caused by biotic and abiotic factors. *J. Chem. Ecol.*, 20(6): 1329-1354.
- THOLL D., BOLAND W., HANSEL A., LORETO F., RÖSE U.S.R., SCHNITZLER J.P., 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant J.*, 45:540-560.
- TRANFAGLIA A., ARPAIA S., 1988. Comportamento biologico e prove sperimentali di lotta contro *Liriomyza trifolii* (Burgess) minatrice della gerbera nella zona vesuviana. *Il Floricoltore*, 6: 57-64.
- TREMBLAY E., 1999. Entomologia applicata. Vol. I. Generalità e mezzi di controllo- Liguori Ed., Napoli: 269 pp.
- TUMLINSON J.H., LEWIS W.J., VET L.E.M., 1993. How parasitic wasps find their hosts. *Sci. Am.* 268(3): 100-106.
- TURLINGS T.C.J., TUMLINSON J.H., 1991. Do parasitoids use herbivore-induced plant chemical defenses to locate hosts? *Fla. Entomol.*, 74(1): 42-50.

- TURLINGS T.C.J., TUMLINSON J.H., 1992. Systemic release of chemical signals by herbivore-injured corn. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(17): 8399-8402.
- TURLINGS T.C.J., TUMLINSON J.H., LEWIS W.J., 1990. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, 250: 1251-1253.
- TURLINGS T.C.J., LOUGHRIN J.H., MCCALL P.J., RÖSE U.S.R., LEWIS W.J., TUMLINSON J.H., 1995. How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(10): 4169-4174.
- VERCAMMEN J., SANDRA P., BALTUSSEN E., SANDRA T., DAVID F., 2000. Considerations on static and dynamic sorptive and adsorptive sampling to monitor volatiles emitted by living plants. *J. High Resol. Chromatogr.*, 23(9): 547-553.
- VET L.E.M., DICKE M., 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Ann. Rev. Entomol.*, 37: 141-172.
- VIGGIANI G., 1964. La specializzazione entomoparassitica in alcuni Eulofidi (*Hym.*, *Chalcidoidea*). *Entomophaga*, 9(1): 111-118.
- WALLING L.L., 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regul.*, 19: 195-216.
- WEI J.N., KANG L., 2006. Electrophysiological and behavioral responses of a parasitic wasp to plant volatiles induced by two leaf miner species.- *Chem. Senses*, ., 31(5): 467-477.
- WEI J.N., ZHU J., KANG L., 2006. Volatiles released from bean plants in response to agromyzid flies. *Planta*, 224(2): 279-287.
- WOLFENDER J. L., MAILLARD M., HOSTETTMANN K., 1993. Liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric analysis of crude plant

extracts containing phenolic and terpene glycosides. *J. Chromatogr.*, 647(2): 183-190.

ZHANG Z., PAWLISZYN J., 1993. Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 65(14): 1843-1852.

ZHAO Y. X., KANG L., 2002. The role of plant odours in the leafminer *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) and its parasitoid *Diglyphus isaea* (Hymenoptera: Eulophidae): orientation towards the host habitat. *Eur. J. Entomol.*, 99(4): 445-450.

ZOEBISCH T.G., SCHUSTER D.J., 1987. Longevity and fecundity of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) exposed to tomato foliage and honeydew in the laboratory. *Envirov. Entomol.*, 16(4): 1001-1003.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare tutte le persone con cui, in questi tre anni di Dottorato, ho avuto la fortuna di lavorare e che mi hanno aiutato nella realizzazione di questa tesi.

Inizierei ringraziando il mio tutore, il Prof. **Stefano Maini**, per la disponibilità, i preziosi consigli e la fiducia che mi ha sempre dimostrato, il Prof. **Piero Baronio**, coordinatore del corso di Dottorato e la Dott.ssa **Luisa Dindo**, per l'infinita disponibilità.

Un ringraziamento particolare va al Prof. **Franco Frilli** e al Prof. **Norberto Milani**, che mi hanno accolto nei laboratori di Entomologia dell'Università di Udine e al Dott. **Francesco Nazzi**, un amico e un grande ricercatore, che ha creduto sin da subito in questo progetto, aiutandomi a realizzarlo.

Un grazie infinito va al Dott. **Giovanni Burgio**, ad **Alberto**, che mi ha sempre sostenuto anche nei momenti di sconforto e a cui dedico tutti i risultati raggiunti in questo studio, a tutti **colleghi e amici dell'area di Entomologia di Bologna** e alla **mia famiglia**, per avermi sostenuto in questi anni.